



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών**

**Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας-Μοριακή Γενετική-Διαγνωστικοί Δείκτες**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΟΥ  
ΓΟΝΙΔΙΟΥ TNFSF11 ΜΕ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΝΤΙ-TNF $\alpha$ ,  
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΙΔΙΟΠΑΘΕΙΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΝΟΣΟΥΣ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ.**

**Παπαδοπούλου Σουσάνα**

**Λάρισα 2015**

**Φαρμακογενετική μελέτη συσχέτισης λειτουργικού πολυμορφισμού του γονιδίου *TNFSF11* με ανταπόκριση στη θεραπεία με παράγοντες αντι-TNFα, σε ασθενείς με ιδιοπαθείς φλεγμονώδης νόσους του εντέρου.**

**Pharmacogenetic study of the association between a functional polymorphism in *TNFSF11* gene and the response to anti-TNFα therapy, in patients with inflammatory bowel disease.**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

### **Σαραφίδου Θεολογία**

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **Μαμούρης Ζήσης**

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **Σπυρίδων Ποταμιάνος**

Αναπληρωτής Καθηγητής Γαστρεντερολογίας  
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 Ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου (ΙΦΝΕ).....	8
1.2 Επιδημιολογία της νόσου.....	8
1.3 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΙΦΝΕ.....	9
1.4 Δείκτης αξιολόγησης των ΙΦΝΕ.....	10
1.5 Οι ΙΦΝΕ σχετίζονται με γενετικούς και περιβαλλοντικούς Παράγοντες.....	10
1.5.1 Γενετικοί παράγοντες.....	11
1.5.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες.....	12
1.6 Ανοσοπαθολογία.....	13
1.7 Θεραπεία των ΙΦΝΕ.....	14-18
1.8 TNFα και αντι-TNFα βιολογικοί παράγοντες.....	18
1.8.1 Tumor Necrosis Factor-α (TNFα).....	19
1.8.2 Αντι-TNFα βιολογικοί παράγοντες.....	19
1.9 Νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις.....	20
1.10 Φαρμακογενετική.....	21
1.10.1 Φαρμακογενετικές μελέτες σε ασθενείς με ΙΦΝΕ.....	21-24
1.11 Σκοπός.....	24
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1 Δείγματα ασθενών.....	25
2.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από περιφερικό αίμα.....	25
2.3 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του DNA.....	26-27
2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	28-29

2.5	Πέψη με περιοριστικό ένζυμο.....	30
2.6	Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης-ουρίας.....	30-31
2.7	Αλληλούχηση (Sequencing).....	31
2.8	Στατιστική ανάλυση.....	32
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1	Ασθενείς.....	33
3.2	Αποτελέσματα απομόνωσης DNA από αίμα.....	34
3.3	Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με διαβαθμίσεις (PCR gradient).....	34
3.4	Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).....	35
3.5	Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 6%.....	35
3.6	Αλληλούχηση.....	36-37
3.7	Γονοτύπηση.....	38-39
3.8	Στατιστική ανάλυση συσχέτισης του πολυμορφισμού -290T/C του γονιδίου RANKL με ανταπόκριση στην θεραπεία με αντι-TNFα παράγοντες.....	39-41
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	42-43
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	44-48

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου συνίστανται στην νόσο του Crohn και την ελκώδη κολίτιδα. Αποτελούν αυτοάνοσα πολυπαραγοντικά νοσήματα και έχουν συχνότητα εμφάνισης ~0,1 % στον γενικό πληθυσμό όμως τα τελευταία χρόνια έχουν ραγδαία αυξητική τάση. Η ελκώδης κολίτιδα προκαλεί φλεγμονές στο εσωτερικό του παχέος εντέρου ενώ η νόσος του Crohn μπορεί να εμφανίσει φλεγμονή σε οποιοδήποτε κομμάτι του γαστρεντερικού σωλήνα, από το στόμα έως το κόλον, και σε πολλά διαφορετικά μέρη ταυτοχρόνως. Η συχνότητα εμφάνισης είναι ίδια και στα δύο φύλα. Οι ΙΦΝΕ έχουν γενετικό υπόβαθρο αλλά μεγάλο ρόλο στην εμφάνιση τους παίζουν και οι περιβαλλοντικές συνθήκες.

Οι ασθενείς με ΙΦΝΕ ακολουθούν συμβατικές ή ανοσοτροποποιητικές θεραπείες ανάλογα με τα συμπτώματά τους. Αν όμως αποτύχουν αυτές οι θεραπείες τότε οι αντι-TNFα παράγοντες (Infliximab-IFX, Adalimumab-ADA) συνιστούν αποτελεσματική λύση. Η είσοδος τους στην θεραπεία των ΙΦΝΕ έχει φέρει επανάσταση καθώς ένα ποσοστό 60-70% των ασθενών ανταποκρίνεται θετικά. Στην μεγαλύτερη φαρμακογενωμική μελέτη (n=738) που έγινε το 2014 έδειξε πως το κλασσικό μονοπάτι ενεργοποίησης του *NFκB* παίζει ρόλο στην πρόβλεψη της ανταπόκρισης των ασθενών με ΙΦΝΕ σε θεραπεία με αντι-TNFα παράγοντες (Bank et al,2014).

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του εναλλακτικού μονοπατιού ενεργοποίησης του *NFκB* και συγκεκριμένα ενός λειτουργικού πολυμορφισμού, του rs9525641, ο οποίος βρίσκεται στον υποκινητή του γονιδίου *TNFSF11*.

Τον πληθυσμό της μελέτης αποτέλεσαν 52 ασθενείς με νόσο του Crohn (86.5%) ή ελκώδη κολίτιδα (13.5%) οι οποίοι γονοτυπήθηκαν ως προς τον πολυμορφισμό -290 T/C (rs9525641) του γονιδίου *TNFSF11*, με αλληλούχηση των προϊόντων της PCR. Η ανταπόκριση των ασθενών στην θεραπεία αξιολογήθηκε βάση της μεταβολής του δείκτη βαρύτητας CDAI, σε διάρκεια 24 μηνών. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τεστ αλληλομόρφων και γονοτύπων ( $P \leq 0,05$ ).

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν πως το 56% των ασθενών ανταποκρίθηκαν θετικά στην θεραπεία και εισήλθαν σε ύφεση. Η ανάλυση σε όλους τους ασθενείς με ΙΦΝΕ και στους δύο αντι-TNFα βιολογικούς παράγοντες δεν έδειξε καμία στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με την ανταπόκριση στην θεραπεία ( $P=0.152$ ). Ακολούθησε κατηγοριοποίηση των ασθενών ως προς το φάρμακο που λαμβάνουν και έδειξε πως στους ασθενείς που λάμβαναν Infliximab υπήρχε σημαντική αύξηση της συχνότητας του αλληλομόρφου -290C στους ανταποκριθέντες (0.57) σε σχέση με τους μη-ανταποκριθέντες (0.26) ( $P=0.023$ ).

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν την πρώτη ένδειξη συμμετοχής και του εναλλακτικού μονοπατιού ενεργοποίησης του *NFκB* στην ανταπόκριση των ασθενών με ΙΦΝΕ, που λαμβάνουν θεραπεία με παράγοντες αντι-TNFα.

## ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases constitute a group of autoimmune and inflammatory diseases of the gastrointestinal tract, such as Crohns disease (CD) and ulcerative colitis(UC). Both CD and UC are autoimmune diseases which depend on genetic factors but are also triggered by environmental factors and affect approximately 0,1% people worldwide, both men and women with the same percentage. UC causes ulcers in the internal walls of the colon but CD can cause inflammation all the way through the gastrointestinal tract.

Patients with IBD can be treated with conventional or immunosuppressive therapies, depending on the severity of the symptoms. If those treatments fail then anti-TNF $\alpha$  biological agents (Infliximab-IFX, Adalimumab-ADA) are considered very effective treatment leading to a percentage of 60-70% of the patients reacting positively to this therapy. In 2014 a large pharmacogenomic study in the Danish population, pointed out the role of the classical pathway of *NFkB* activation in the prediction of response to therapy to anti-TNF $\alpha$  in IBD patients. (Bank et al,2014)

The aim of this study is to explore also the role of the alternative pathway of *NFkB* and particularly a fuctional polymorphism, the rs9525641, which is located in the promoter of *TNFSF11* gene.

The population we studied consisted of 52 patients with Crohns disease (86.5%) or ulcerative colitis (13.5%) which were genotyped for the polymorphism -290 T/C (rs9525641) of *TNFSF11* gene, with direct sequencing of PCR products. The response of the patients to the treatment was evaluated based on the variation of CDAI index, during 24 months of treatment. Statistical analysis was performed, using genotype and allele tests ( $P\leq 0,05$ ).

The result revealed that 56% of the patients responded positively to treatment and showed a recession. Statistical analysis including all patients and both anti-TNF agents showed no statistical significant correlation with response to therapy ( $P=0,152$ ). Although, stratification of the patients by the type of anti-TNF $\alpha$  they received showed that the ones who received infliximab, had a significant increase in the frequency of -290C allele in responders (0.57) compared to non responders (0.26) ( $P=0,023$ ).

These results suggests for the first time the role also of the alternative pathway of *NFkB* activation in IBD patients and response to anti-TNF $\alpha$  therapy.

## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου (ΙΦΝΕ)

Οι ΙΦΝΕ συνίστανται στην νόσο του Crohn και την ελκώδη κολίτιδα. Είναι αυτοάνοσα πολυπαραγοντικά νοσήματα και προκαλούν φλεγμονή στο γαστρεντερικό σωλήνα. Συγκεκριμένα λόγω της συνεχούς ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού, παράγονται κυτταροκίνες, χημειοκίνες και TNFα με αποτέλεσμα την συνεχή φλεγμονή. Η νόσος του Crohn χαρακτηρίζεται από εμφάνιση φλεγμονών σε οποιοδήποτε κομμάτι κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα, από το στόμα μέχρι και το κόλον ενώ η ελκώδης κολίτιδα προκαλεί φλεγμονή μόνο στο παχύ έντερο (Warren Strober et al,2007). Δεν είναι γνωστά τα ακριβή αίτια της εμφάνισης των ΙΦΝΕ αλλά είναι γνωστό ότι είναι πολυπαραγοντικές ασθένειες στις οποίες εμπλέκονται περιβαλλοντικοί παράγοντες, γενετική προδιάθεση και η ανοσολογική απόκριση (Baumgart DC et al, 2007).

### 1.2 Επιδημιολογία της νόσου

Οι ΙΦΝΕ προσβάλουν περίπου το 0,1 % του γενικού πληθυσμού και έχουν την ίδια συχνότητα εμφάνισης και στα δύο φύλα. Έχει παρατηρηθεί ραγδαία αυξητική τάση τα τελευταία χρόνια ειδικά στους δυτικούς πληθυσμούς. Συγκεκριμένα τα τελευταία 50 χρόνια η αύξηση των ασθενών με νόσο του Crohn είναι από 6-15 σε 50-200/100.000 και για την ελκώδη κολίτιδα από 8-14 σε 120-200/100.000 ασθενείς (Cosnes J et al, 2011).

Οι ΙΦΝΕ φαίνεται πως έχουν μεγάλη συχνότητα εμφάνισης στον εβραϊκό πληθυσμό ενώ μικρή συχνότητα εμφάνισης εμφανίζετε στους Ρομά στην Ουγγαρία. Η μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου είναι στην δεύτερη, στην τρίτη και στην έκτη δεκαετία όμως μπορεί να εμφανιστεί και σε οποιαδήποτε ηλικία (Karlinger K et al, 2000).

Όσον αφορά στην κληρονομικότητα των ΙΦΝΕ, μελέτες που έχουν γίνει σε διδύμους δείχνουν πως στους μονοζυγωτικούς διδύμους το ποσοστό εμφάνισης της νόσου του Crohn και στα δύο αδέρφια κυμαίνεται στο 20%-50% ενώ σε διζυγωτικούς περίπου με 10%. Στην ελκώδη κολίτιδα τα ποσοστά είναι 16% σε μονοζυγωτικούς και 4% σε διζυγωτικούς κάτι που δείχνει πως οι ΙΦΝΕ έχουν κληρονομικό υπόβαθρο. Ακόμα, εάν και οι δύο γονείς πάσχουν από ΙΦΝΕ ο απόγονος τους έχει 30% πιθανότητες να νοσήσει πριν την ηλικία των 30 ετών (Leena Halme et al, 2006).

Στην Ελλάδα οι ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα το 1994 ήταν 12 φορές περισσότεροι από τους ασθενείς με νόσο του Crohn και την περίοδο 1992-1997 οι ασθενείς με ΙΦΝΕ διπλασιάστηκαν σε σχέση με την προηγούμενη δεκαετία (Tsianos EV et al, 1994), (E.V. Tsianos et al 2005).



Σε μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος (GWAS, genome wide association scan) (Barret JC et al,2008) αλλά και μετα-αναλύσεις (Franke A. et al, 2010), που έγιναν για την εύρεση γενετικών τόπων που σχετίζονται με τις ΙΦΝΕ βρέθηκε πως υπάρχουν 163 πολυμορφισμοί που συνδέονται με τις ΙΦΝΕ εκ των οποίων οι περισσότεροι συμβάλουν και στους δύο φαινότυπους, πολλοί εκ των οποίων βρίσκονται σε γονίδια που συμμετέχουν στην ανοσοαπόκριση. Επίσης πολλοί από τους πολυμορφισμούς συνδέονται και με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα όπως την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα και την ψωρίαση. Τέλος πολλοί από αυτούς τους πολυμορφισμούς που παρατηρούνται στις ΙΦΝΕ συνδέονται με μυκοβακτηριακή φλεγμονή (L.Jostins et al, 2012).

### **1.3 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΙΦΝΕ**

Οι ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο του Crohn εμφανίζουν φλεγμονή κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα κάτι που σημαίνει πως μπορεί να υπάρχει φλεγμονή από το στόμα έως και το κόλον σε οποιοδήποτε κομμάτι ή και σε πολλά συγχρόνως. Συγκεκριμένα μπορεί να εμφανίζεται η φλεγμονή τμηματικά ανάμεσα σε υγιή τμήματα του γαστρεντερικού σωλήνα και η φλεγμονή μπορεί να μολύνει όχι μόνο το εσωτερικό αλλά οποιοδήποτε μέρος των τοιχωμάτων του εντέρου. Τα συμπτώματα της ασθένειας είναι συνήθως κοιλιακό άλγος, διάρροια παρουσία αίματος ή βλέννας απώλεια όρεξης αλλά και μη εντερικά συμπτώματα όπως απώλεια βάρους, πυρετό, φλεγμονή στο εσωτερικό του οφθαλμού, στο δέρμα δημιουργώντας οζώδες ερύθημα αλλά συνδέεται και με ένα είδος ρευματολογικής ασθένειας, την σπονδυλοαρθροπάθεια. Οι ασθενείς με νόσο του Crohn μπορεί να εμφανίσουν επιπλοκές όπως την απόφραξη του λεπτού εντέρου, την δημιουργία συριγγίων και αποστημάτων (Martin W. Laass et al,2014). Η απόφραξη του εντέρου οφείλεται σε συνεχή στένωση λόγω της φλεγμονής με αποτέλεσμα να μην μπορεί να περάσει η τροφή από εκεί ενώ τα συρίγγια δημιουργούνται από έλκη που εξελίσσονται σε διατοιχωματικές σχισμές και σε φλεγμονή με συνέπεια την προσκόλληση του εντέρου είτε σε γειτονικά όργανα είτε σπανιότερα, εξωτερικά προς το δέρμα (Michael Scharl et al,2014). Τέλος τα αποστήματα είναι μολυσμένα ανοιχτά τοιχώματα. Ακόμα στην νόσο του Crohn παρατηρούνται κοκκιώματα δηλαδή κύτταρα που συσσωρεύονται για να αντιμετωπίσουν την φλεγμονή γι'αυτό και ονομάζεται η νόσος και κοκκιωματώδης κολίτιδα. Τα κοκκιώματα εμφανίζονται μόνο στην νόσο του Crohn και όχι στην ελκώδη κολίτιδα κάτι που τα καθιστά ένα καλό διαγνωστικό δείκτη. (D. Heresbach et al,2015) Οι ασθενείς που πάσχουν από ελκώδη κολίτιδα εμφανίζουν φλεγμονή στο σιγμοειδές και στο παχύ έντερο και εμφανίζουν μόλυνση μόνο στο εσωτερικό τοίχωμα του εντέρου. Επίσης η φλεγμονή που προκαλεί είναι συνεχής χωρίς ενδιάμεσες περιοχές υγιούς ιστού στο ασθενές τμήμα. Τα συμπτώματα είναι και εδώ, κοιλιακό άλγος, διάρροια παρουσία αίματος ή βλέννας, απώλεια όρεξης αλλά και μη εντερικά συμπτώματα όπως απώλεια βάρους, πυρετό, φλεγμονή στο εσωτερικό του οφθαλμού και αρθρίτιδα. Επιπλοκές της ελκώδους κολίτιδας είναι η έντονη αιμορραγία λόγω των ελκών, η ρήξη του παχέος εντέρου και διάταση του εντέρου (τοξικό megacolon) (Sagar Garud et al, 2009), (Chang-Tai Xu et al, 2004). Στην εικόνα 1 φαίνονται οι φλεγμονές που προκαλούν οι ΙΦΝΕ στο έντερο.



Εικόνα 1: Στο αριστερό μέρος της εικόνας φαίνεται το εσωτερικό τοίχωμα ενός φυσιολογικού εντέρου, στο μεσαίο κομμάτι της εικόνας φαίνεται η φλεγμονή που προκαλεί η ελκώδης κολίτιδα στο εσωτερικό του εντέρου, ενώ στα δεξιά της εικόνας φαίνεται η φλεγμονή που προκαλεί η νόσος του Crohn στο εσωτερικό του εντέρου (Lerppkes M et al, 2014)

#### 1.4 Δείκτης αξιολόγησης των ΙΦΝΕ

Ο δείκτης αξιολόγησης των ασθενών με ΙΦΝΕ είναι ο CDAI (Crohn's disease activity index). Ο συγκεκριμένος δείκτης χρησιμοποιείται σε διάφορες κλινικές μελέτες αλλά χρησιμοποιήθηκε και στην μεγαλύτερη φαρμακογενετική έρευνα όσον αφορά τις ΙΦΝΕ από Δανούς επιστήμονες. Η μέτρηση γίνεται πριν την έναρξη της θεραπείας, κατά την διάρκεια και στο τέλος. Η (CDAI) τιμή ορίστηκε  $< \dot{=} 150$  μονάδες) και η κλινική ανταπόκριση με μείωση του CDAI  $> \dot{=} 100$  μονάδες, σε ασθενείς που είχαν αρχικό CDAI τιμή  $> \dot{=} 220$  ( Best WR et al, 1976).

Η μέτρηση περιλαμβάνει ένταση κοιλιακού άλγους, αιματοκρίτη, σωματικό βάρος κ.α. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0048967/>).

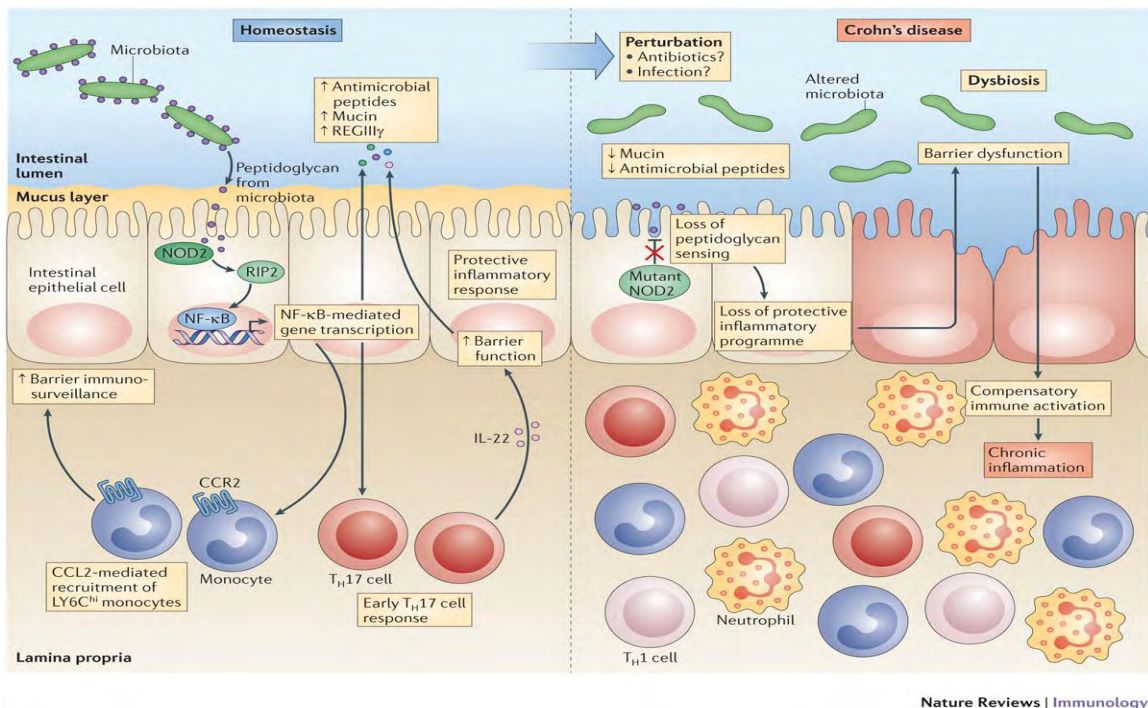
#### 1.5 Οι ΙΦΝΕ σχετίζονται με γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Οι ΙΦΝΕ είναι πολυπαραγοντικές ασθένειες κάτι που σημαίνει πως δεν είναι μία η αιτία εμφάνισης τους αλλά πολλοί παράγοντες σε συνδυασμό. Έχουν δηλαδή και γενετικό και περιβαλλοντικό υπόβαθρο τα οποία σε συνδυασμό προκαλούν την εμφάνιση των ΙΦΝΕ και αυτοί οι παράγοντες παρουσιάζονται παρακάτω (J.-P. Hugot et al, 1999).

### 1.5.1 Γενετικοί παράγοντες

Τα ακριβή αίτια εμφάνισης των ΙΦΝΕ δεν είναι γνωστά ακόμα αλλά τα τελευταία χρόνια έχουν βρεθεί πολυμορφισμοί σε γονίδια που έχουν άμεση συσχέτιση με την εμφάνιση των ΙΦΝΕ.

Ένα από τα πρώτα γονίδια που μελετήθηκε είναι το *NOD2* / *CARD15* (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2). Το *NOD2* είναι ένα γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 16q21 και ανήκει στην οικογένεια Nod1/Araf-1 και κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη με 2 περιοχές πρόσδεσης κασπασών (*CARD*- caspase recruitment domains) και 6 πλούσιες σε λευκίνες επαναλήψεις (LRRs-leucine-rich repeats). Η πρωτεΐνη αρχικά εκφράζεται στα λευκοκύτταρα του αίματος. Παίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση σε ενδοκυττάριους βακτηριακούς λιποσακχαρίτες με το να αναγνωρίζει το διπεπτίδιο MDP και να ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα NFκ-B οπότε θα ενεργοποιήσει την δημιουργία κυτταροκινών που θα αντιμετωπίσουν την φλεγμονή και δεν θα επιτρέψουν στον να παραμείνει και να γίνει χρόνια (Warren Strober et al, 2007). Μεταλλάξεις στο γονίδιο *NOD2* μειώνουν την σωστή ανοσοαπόκριση με αποτέλεσμα να προχωράει η φλεγμονή και να γίνεται χρόνια. Τριάντα μη συντηρημένοι πολυμορφισμοί έχουν βρεθεί σε αυτό το γονίδιο, εκ τω οποίων οι τρεις είναι κοινοί (Arg702Trp, Gly908Arg, Leuc1007insC) και η ύπαρξη τους σχετίζεται με εμφάνιση της νόσου του Crohn ενώ δεν σχετίζονται με την ελκώδη κολίτιδα. Γενετικοί πολυμορφισμοί στο *CARD15* λειτουργούν ως προγνωστικοί δείκτες για την πιθανότητα εμφάνισης της ασθένειας, όπου ύπαρξη ενός πολυμορφισμού δίνει μικρό ρίσκο ενώ η ύπαρξη ενός δεύτερου ανεβάζει κατά πολύ το ρίσκο (Erameinondas V Tsianos et al, 2011).



Εικόνα 2: Στην εικόνα φαίνεται το μονοπάτι του *NOD2* και η ανοσοαπόκριση ενώ δεξιά φαίνεται πως μια μετάλλαξη στο *NOD2* εμποδίζει την ενεργοποίηση του NFκ-B και έτσι συνεχίζεται η φλεγμονή (Dana J. Philpott et al, 2014).

Επίσης στη νόσο του Crohn, βρέθηκε συσχέτιση με πολυμορφισμούς στα γονίδια που κωδικοποιούν για τους οργανικούς φορείς κατιόντων (OCTNs). Αυτοί είναι διαμεμβρανικοί μεταφορείς φαρμάκων και θετικά φορτισμένων ενδογενών μεταβολιτών. Πολυμορφισμοί στους OCTNs επηρεάζουν την ομοιόσταση του κυττάρου και σχετίζονται με την Crohn (Erameinondas V Tsianos et al,2011).

Όταν υπάρχει φλεγμονή στον οργανισμό, όπως με τις ΙΦΝΕ, ενεργοποιείται η ανοσοαπόκριση. Μέρος σε αυτήν λαμβάνουν και οι TLRs (Toll-like receptors) οι οποίοι είναι περίπου δέκα διαφορετικοί και αναγνωρίζουν συγκεκριμένα παθογόνα. Πολυμορφισμοί σε αυτούς σχετίζονται με προβλήματα στην ανοσοαπόκριση και σχετίζονται με την εμφάνιση των ΙΦΝΕ (Erameinondas V Tsianos et al, 2011).

Στον τομέα των κυτταροκινών, φαίνεται πως πολυμορφισμοί στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την IL-23, σχετίζονται με τις ΙΦΝΕ διότι η IL-23 είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων μνήμης (Erameinondas V Tsianos et al,2011).

Μία άλλη κυτταροκίνη είναι η ιντερλευκίνη 22 (IL-22) η οποία βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12q15 και παράγεται από τα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα. Οι υποδοχείς του είναι οι IL-10R2 και IL-22R1 και πολυμορφισμοί σε αυτούς έχουν συσχετιστεί θετικά με την νόσο του Crohn και την ελκώδη κολίτιδα. Η IL-22 μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού JAK-STAT, αυξάνει τα πολλαπλασιαστικά και αντιαποπτωτικά μονοπάτια τα οποία οδηγούν στην παραγωγή αντιμικροβιακών πρωτεϊνών που βοηθούν στο να αποτρέψουν την καταστροφή ιστού και προάγουν την αποκατάσταση του. Επίσης η IL-22 συνδέεται με γονίδια που συσχετίζονται με ευαισθησία στις ΙΦΝΕ, δηλαδή γονίδια υπεύθυνα για ρύθμιση της απόκρισης κατά την μόλυνση. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι στο μονοπάτι ενεργοποίησης του STAT3, η IL-22 αυξάνει τον πολλαπλασιασμό και την αναδόμηση των επιθηλιακών κυττάρων του βλεννογόνου του εντέρου κάτι που εμποδίζει την είσοδο μικροοργανισμών (Lin-Jing Li et al,2014). Τέλος η IL-22 είναι αυξημένη σε ασθενείς με Crohn και ενισχύει την έκφραση γονιδίων που θα προλάβουν την φλεγμονή αλλά και την μετακίνηση των IEC (intestinal epithelial cells) σε σημεία που υπάρχει φλεγμονή ( Brand S et al,2006).

### **1.5.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες**

Πέραν της γενετικής προδιάθεσης οι ΙΦΝΕ είναι πολυπαραγοντικά νοσήματα κάτι που σημαίνει πως μεγάλο ρόλο στην εμφάνιση και αντιμετώπιση των ΙΦΝΕ παίζουν το περιβάλλον και ο τρόπος ζωής. Τα ποσοστά εμφάνισης των ΙΦΝΕ είναι αυξημένα στις δυτικές χώρες και συνεχίζουν να έχουν αυξητικές τάσεις. Η ζωή στις ανεπτυγμένες, κυρίως

δυτικές χώρες οι οποίες συνδέονται με αυξημένη ατμοσφαιρική ρύπανση, ιδιαίτερες διατροφικές συνήθειες και αγχώδη καθημερινότητα ευθύνονται για την εμφάνιση τέτοιων ασθενειών. Επίσης το γεγονός της αυξημένης υγιεινής και καθαριότητας στις ανεπτυγμένες χώρες και η έλλειψη επαφής με παθογόνους μικροοργανισμούς, έχει κατηγορηθεί για την εμφάνιση αυτών των αυτοάνοσων ασθενειών (Natalie A. Molodecky et al, 2010). Αρνητικές επιπτώσεις φαίνεται πως έχει και το κάπνισμα το οποίο κατηγορείται για μεγάλη επιδείνωση στην πορεία και στην εμφάνιση της νόσου του Crohn και συχνά τους οδηγεί σε χειρουργείο αλλά εν αντίθεση, το κάπνισμα έχει τα αντίστροφα αποτελέσματα στην ελκώδη κολίτιδα δηλαδή φαίνεται πως ίσως και να σταθεροποιεί την νόσο (Ashwin N. Ananthakrishnan, 2012).

## 1.6 Ανοσοπαθολογία

Η εμφάνιση των ΙΦΝΕ φαίνεται πως οφείλετε σε πολλούς παράγοντες και συγκεκριμένα σε συνδυασμό περιβαλλοντικών παραγόντων, γονιδίων που συμμετέχουν στην ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης και στην σχέση μεταξύ των μικροοργανισμών που υπάρχουν στην χλωρίδα του εντέρου με τον ξενιστή. Σε κάθε άνθρωπο υπάρχουν στην φυσιολογική χλωρίδα του εντέρου αποικίες βακτηρίων που βρίσκονται σε συνεχή ισορροπία με την ανοσοαπόκριση. Συγκεκριμένα, τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, τα κύτταρα που συμμετέχουν στην ανοσοαπόκριση και οι μικροοργανισμοί αλληλεπιδρούν με ένα περίπλοκο σύστημα ώστε να ενεργοποιηθεί η ανοσοαπόκριση και είτε να διωχθεί το παθογόνο είτε να γίνει ανεκτό στον οργανισμό επειδή σχετίζεται με την διατροφή. Η απορρύθμιση αυτής της σχέσης μεταξύ της ανοσολογικής απόκρισης και των μικροοργανισμών του εντέρου φαίνεται να είναι ένας από τους λόγους στην εμφάνιση των ΙΦΝΕ. Γενετικοί παράγοντες οδηγούν σε απορρύθμιση της ανοσοαπόκρισης της βλεννογόνου του εντέρου με αποτέλεσμα υπερβολική ανοσοαπόκριση στην φυσιολογική χλωρίδα του εντέρου και καταστροφή της βλεννογόνου του εντέρου (David Q Shih et al, 2008).

Όταν ο οργανισμός έρχεται αντιμέτωπος με ένα παθογόνο η πρώτη γραμμή άμυνας είναι η ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας η οποία, όσον αφορά στο έντερο συμπεριλαμβάνει την βλεννογόνο του εντέρου, τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και όλα τα κύτταρα που συμμετέχουν στην φυσική ανοσία (ουδετερόφιλα, μακροφάγα, δενδριτικά και λεμφοκύτταρα ILCs. Η επιφάνεια του εντέρου καλύπτεται από ένα στρώμα βλέννας η οποία παράγεται από τα καλυκοειδή κύτταρα που βρίσκονται στο επιθήλιο του εντέρου. Το εσωτερικό στρώμα και το εξωτερικό στρώμα της βλέννας έχουν αντιμικροβιακή δράση. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *MUC2* που συμμετέχει στην δημιουργία της βλεννογόνου, άτομα με ελλιπή λειτουργία των καλυκοειδών κυττάρων αλλά και με ανεπαρκές στρώμα βλέννας αφήνουν τα μικρόβια να περάσουν την βλέννα και να μολύνουν το επιθήλιο οπότε και οδηγούν σε εμφάνιση ΙΦΝΕ. Το επιθήλιο του εντέρου είναι υπεύθυνο για την απορρόφηση, την επεξεργασία και την χώνεψη της τροφής και αποτελείται από τα εντεροκύτταρα υπεύθυνα για την απορρόφηση, τα καλυκοειδή κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την βλέννα, τα κύτταρα Paneth τα οποία εκκρίνουν ντιφενσίνες για προστασία από λοιμώξεις και εντεροενδοκρινή κύτταρα που παράγουν ορμόνες. Προβλήματα κατά την δημιουργία ή σταθερότητα του επιθηλιακού στρώματος στο έντερο μπορεί να οδηγήσει σε χρόνια μόλυνση. Ακόμα, για την μεταφορά σημάτων όπως ειδοποίηση για φλεγμονή και

ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού υπάρχουν οι toll like υποδοχείς και οι NOD like υποδοχείς αλλά και οι κυτταροκίνες IFN- $\gamma$ , IL-17 και IL-22 οπότε μεταλλάξεις που κωδικοποιούν για αυτά τα γονίδια μπορεί να οδηγούν σε ελλιπή μετάδοση σήματος και να προκαλούν τις ΙΦΝΕ.

Ένα άλλο κομμάτι που παίζει μεγάλο ρόλο είναι η αυτοφαγία για την αντιμετώπιση παθογόνων οπότε, προβλήματα στην σωστή λειτουργία προκαλούν φλεγμονή. Έχει βρεθεί πως τα γονίδια ATG16L1 και IRGM συνδέονται με προβλήματα στην αυτοφαγία και εμφάνιση της νόσου του Crohn (Kori L Wallace et al, 2014).

## 1.7 Θεραπεία των ΙΦΝΕ

Υπάρχει μια πληθώρα θεραπειών για τους ασθενείς με ΙΦΝΕ οι οποίες ακολουθούνται από τους ασθενείς ανάλογα με το στάδιο της ασθένειας και τα συμπτώματά τους. Οι θεραπείες μπορεί να περιλαμβάνουν απλή αλλαγή στις διατροφικές συνήθειες σε ασθενείς με ήπια συμπτώματα έως και την χειρουργική επέμβαση σε ασθενείς που πάσχουν χρόνια και η φαρμακευτική αγωγή δεν εμπόδισε την επέκταση της φλεγμονής.

- **Αντιφλεγμονώδη**

- **Αμινοσαλικυλικά (5-ASA)**

### **Σουλφασαλαζίνη.**

Η σουλφασαλαζίνη είναι γνωστή ως αμινοσαλικυλικό οξύ (5-ASA) και αποτελεί συνδυασμό δύο φαρμάκων (sulfapyridine και μια ένωση τύπου ασπιρίνης [5-ASA]) που μειώνει την έξαρση στο κόλον και βοηθά να παραμείνει σε ύφεση.

### **Μεσαλαζίνη, Ολσαλαζίνη, Βαλσαλαζίδη**

Αυτά τα νεώτερα φάρμακα στην κατηγορία 5-ASA είναι τόσο αποτελεσματικά όσο η σουλφασαλαζίνη, αλλά τείνουν να έχουν λιγότερες παρενέργειες επειδή δεν περιέχουν την ουσία sulfa. Το ενεργό συστατικό (5-ASA) στη Μεσαλαζίνη υπάρχει σε μια ρητίνη. Η ρητίνη δεν διαλύεται έως ότου φθάσει το χάπι στον τελικό ειλεό και το παχύ έντερο, όπου απελευθερώνει το φάρμακο 5-ASA άμεσα όπου απαιτείται. Η Μεσαλαζίνη είναι αποτελεσματικότερη σε ήπιες ή μέτριες περιπτώσεις της νόσου Crohn, μπορεί να μειώσει τις πιθανότητες μιας υποτροπής της νόσου Crohn μετά από χειρουργική επέμβαση.

Πιθανές παρενέργειες αυτών των φαρμάκων είναι ναυτία, διάρροια και δυσπεψία (John K Triantafillidis et al, 2011).

#### ➤ **Κορτικοστεροειδή**

**Κορτικοστεροειδή** Τα κορτικοστεροειδή είναι παρόμοια με τη κορτιζόλη, ένα στεροειδές που το σώμα παράγει στα επινεφρίδια. Αυτό το ταχείας δράσης φάρμακο μειώνει την έξαρση και συνήθως συνταγογραφείται για να καταπραΰνει ένα οξύ ξέσπασμα. Μειώνοντας αργά την καθημερινή δόση των κορτικοστεροειδών επιτρέπεται στο σώμα να αρχίσει να παράγει κορτιζόλη πάλι από μόνο του. Καθώς παίρνουν κορτικοστεροειδή, μερικοί άνθρωποι μπορεί να έχουν μια γενική αίσθηση ευφορίας, ενώ άλλοι μπορεί να νοιώσουν ένα συναίσθημα ταραχής. Τα κορτικοστεροειδή χρησιμοποιούνται και για τις δύο μορφές των ΙΦΝΕ.

**Budesonide** Η βουδεσονίδη χρησιμοποιείται για να θεραπεύσει ήπιες περιπτώσεις για να μετριάσει την νόσο Crohn του ειλεού ή/και το πάνω μέρος του παχέος εντέρου. Η βουδεσονίδη είναι ένα κορτικοστεροειδές που επιδρά στον οργανισμό συνολικά και το μεγαλύτερο μέρος του φαρμάκου είναι εντεροδιαλυτό. Η βουδεσονίδη και για τις δύο μορφές των ΙΦΝΕ (John K Triantafillidis et al, 2011).

#### ➤ **Ανοσοκατασταλτικά**

##### **Αζαθειοπρίνη, 6- Μερκαπτοπουρίνη, κυκλοσπορίνη**

Η αζαθειοπρίνη, η 6-Μερκαπτοπουρίνη (6-MP) και η Κυκλοσπορίνη είναι μια κατηγορία φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για να καταστείλουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Οι ΙΦΝΕ είναι αυτοάνοσες ασθένειες, και καταστέλλοντας το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να ελαττωθούν τα συμπτώματα. Η αζαθειοπρίνη και η 6-MP αργούν να ενεργήσουν, και συνδυάζονται συχνά με ένα άλλο φάρμακο που ενεργεί γρήγορα, όπως κορτικοειδή. Η δράση της κυκλοσπορίνης είναι γρηγορότερη αλλά συνδέεται με τις σοβαρές παρενέργειες.

##### **Μεθοτρεξάτη**

Η Μεθοτρεξάτη συχνότερα δίνεται με ένεση και τείνει να προκαλέσει ύφεση σε (8) οκτώ έως (10) δέκα εβδομάδες. Μια πόσιμη έκδοση του φαρμάκου είναι επίσης διαθέσιμη. Εάν ένας ασθενής παρατηρεί μια επιστροφή των συμπτωμάτων μετά από την αλλαγή από τις εγχύσεις στην πόσιμη έκδοση της μεθοτρεξάτης, πρέπει να το ελέγξουν με το γιατρό τους. Θα μπορούσε η πόσιμη δόση να μην απορροφάται αρκετά καλά από το σώμα (John K Triantafillidis et al, 2011).

#### ➤ **Βιολογικοί παράγοντες anti-TNFα**

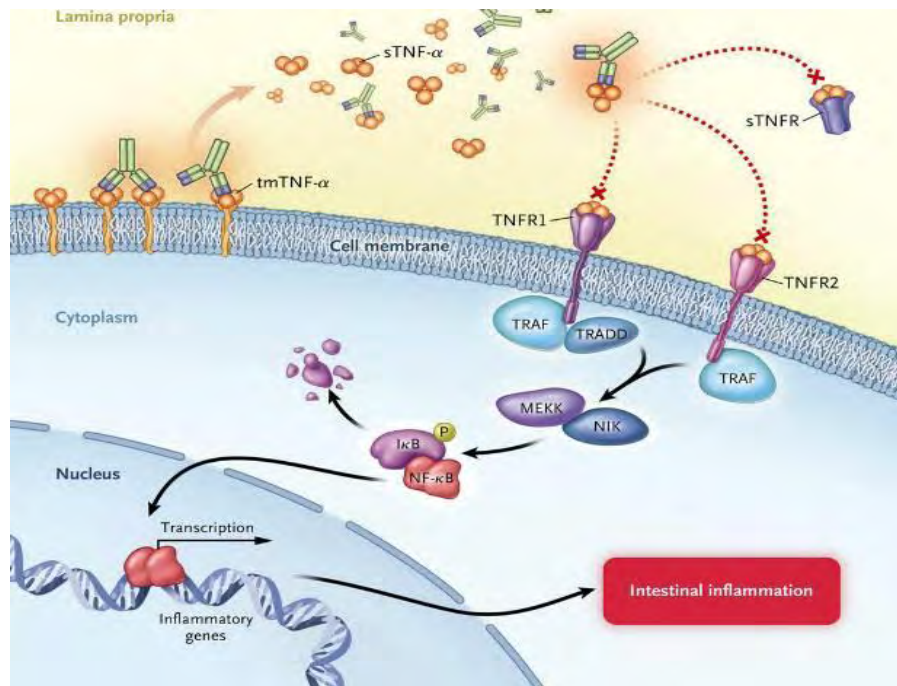
### **Infliximab (Remicade)**

Το Infliximab αποτελεί ένα μονοκλωνικό χημειοθεραπευτικό αντίσωμα που δεσμεύει τον παράγοντα νέκρωσης όγκων άλφα (TNFα). Ο TNFα αποτελεί μια πρωτεΐνη που παράγεται όταν υπάρχει φλεγμονή και η οποία κατηγορείται για την επέκταση της φλεγμονής. Ο TNFα βρίσκεται σε υψηλότερο από τα κανονικά επίπεδα στους ανθρώπους με ΙΦΝΕ. Αρχικά κατασκευάστηκε ως θεραπεία για την νόσο Crohn, τώρα το infliximab έχει εγκριθεί για να θεραπεύει και τις δύο μορφές των ΙΦΝΕ (Travassos WJ et al, 2005). Το Infliximab είναι καλώς ανεκτό στους περισσότερους ασθενείς όμως έχουν καταγραφεί και σοβαρές παρενέργειες όπως εμφάνιση και άλλων αυτοάνοσων ασθενειών, μολύνσεις (Jean-Frederic Colombel et al, 2004) αλλά και την εμφάνιση φυματίωσης κατά την διάρκεια λήψης του φαρμάκου (Joseph Keane et al, 2011).

### **Adalimumab (Humira)**

Το Adalimumab αποτελεί ένα εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα που δεσμεύει τον TNF-α με μεγάλη ειδικότητα. Αρχικά χορηγούνταν μόνο για τους ασθενείς που πάσχουν από την νόσο του Crohn αλλά εδώ και λίγα χρόνια έχει εγκριθεί και για την ελκώδη κολίτιδα (Sandborn WJ et al, 2013). Ασθενείς που λαμβάνουν το Adalimumab εμφανίζουν ύφεση των συμπτωμάτων, θεραπεία στην βλενογόνο του εντέρου αλλά και ύφεση των συριγγίων στους ασθενείς με νόσο του Crohn. Το Adalimumab επίσης, χορηγείται σε ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στο Infliximab ή μετά από χρόνια χρήση παρουσίασαν ανοχή στο φάρμακο. Το Adalimumab εμφανίζει λιγότερες παρενέργειες στους ασθενείς όπως μολύνσεις, μυκητιάσεις Σε πιο σοβαρές περιπτώσεις πνευμονικές και εντερικές μολύνσεις και σε μικρό ποσοστό καρκίνο και φυματίωση (Luisa Guidi et al, 2011).





Εικόνα 3: Σε αυτή την εικόνα παρατηρείται η δράση των anti-TNFα βιολογικών παραγόντων. Όπως φαίνεται δεσμεύουν τον διαλυτό, τον διαμεμβρανικό αλλά και τον συνδεδεμένο στους υποδοχείς του TNFα με αποτέλεσμα την διακοπή μετάδοσης του σήματος, άρα και την διακοπή της περαιτέρω έκφρασης γονιδίων που θα ενισχύσουν την φλεγμονή (Rutgeerts et al, 2009).

- **Συμπτωματικά**

- **Αντιδιαρροικά**

### **Διφenoξυλάτη, Λοπεραμίδη**

Η Διφenoξυλάτη και η Λοπεραμίδη μειώνουν τις συσπάσεις του εντέρου και απορροφούν το πρόσθετο νερό στο παχύ έντερο με αποτέλεσμα τη μείωση της συχνότητας των κενώσεων αλλά και της διάρροιας (Rayhorn et al, 2001).

### **Χολεστυραμίνη**

Η Χολεστυραμίνη μειώνει την ερεθιστική επίδραση των χολικών οξέων στο παχύ έντερο (Alan F. Hofmann et al, 1969).

- **Αναλγητικά (Παυσίπονα)**

## Παρακεταμόλη

Η Παρακεταμόλη ανακουφίζει από τον πόνο και μπορεί να μειώσει και το πρήξιμο των κλειδώσεων.

### ➤ Συμπληρώματα Σιδήρου, Φυλλικού Οξέος και Βιταμίνης B12

Τα παραπάνω δίδονται στους ασθενείς που παρουσιάζουν μείωση των επιπέδων του σιδήρου, του φυλλικού οξέως και της βιταμίνης B12 στον οργανισμό τους κατά τη διάρκεια των εξάρσεων των ΙΦΝΕ ή όταν οι ασθενείς δεν μπορούν να τα απορροφήσουν λόγω σημαντικής βλάβης στο έντερο (C Gasche et al, 2004).

- Αντιβιοτικά

## Μετρονιδαζόλη, Σιπροφλοξασίνη, Κλαριθρομυκίνη

Χρησιμοποιούνται ως αγωγή σε αποστήματα ή για να βοηθήσουν στη μείωση της φλεγμονής του λεπτού ή του παχέος εντέρου (John K Triantafillidis et al, 2011).

Τέλος όταν ο ασθενής δεν ανταποκρίνεται θετικά στη θεραπεία αναγκάζετε να υποβληθεί σε χειρουργείο.

### Όσον αφορά στην ελκώδη κολίτιδα οι επεμβάσεις που γίνονται είναι :

- Κολεκτομή με ειλεοστομία
- Πρωκτολεκτομή με μόνιμη ειλεοστομία
- Ειλεοπρωκτική αναστόμωση (Fazl.Q. Parray et al, 2012).

### Για την νόσο του Crohn οι επεμβάσεις είναι:

- Στενωπλαστική
- Εκτομή
- Πρωκτοκολεκτομή και ειλεοστομία (E.F.Stange et al, 2006).

## 1.8 TNFα και αντι-TNFα βιολογικοί παράγοντες

### 1.8.1 Tumor Necrosis Factor-α (TNFα)

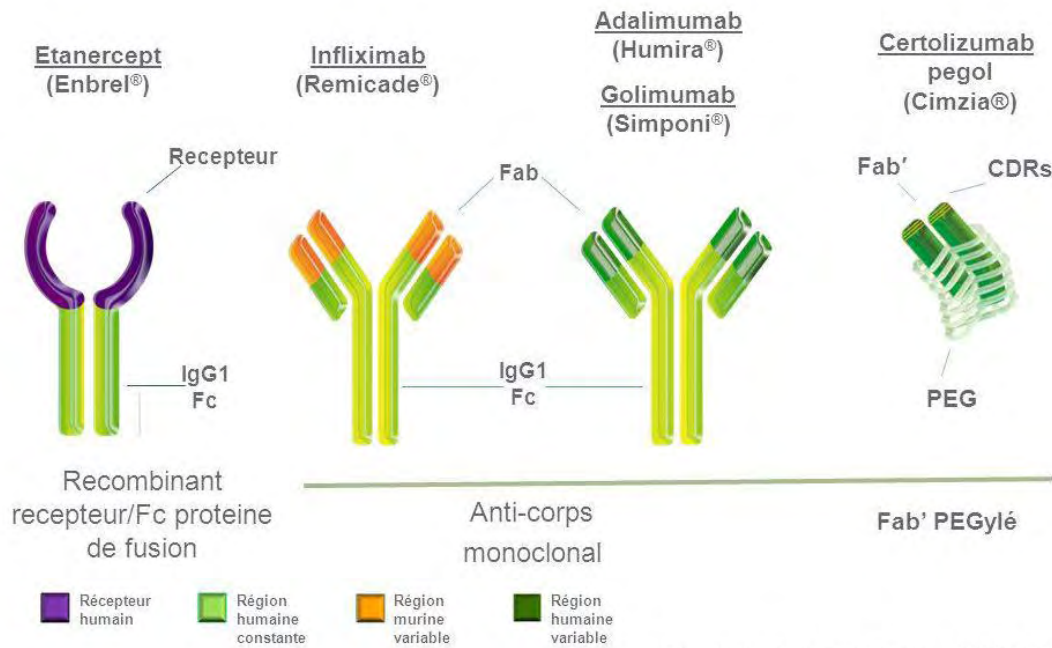
Ο TNF- $\alpha$ , είναι μια κυτταροκίνη που εκφράζεται κυρίως από τα μακροφάγα αλλά και από τα CD4 και τα NK κύτταρα. Ο TNF- $\alpha$  συνδέεται στους υποδοχείς του TNFR1-TNFR2 ( οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια TNFR superfamily, στην οποία συμπεριλαμβάνονται και οι υποδοχείς FAS, CD40, CD27 και RANK ) και έτσι ενεργοποιεί τα αντίστοιχα μονοπάτια μετάδοσης σήματος που μπορεί να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση ή να ενεργοποιήσουν τον μεταγραφικό παράγοντα NF $\kappa$ B (Idriss HT et al, 2000). Τα μονοπάτια που ακολουθεί παρουσιάζονται παρακάτω:

- Μεταγραφή των αντι αποπτωτικών παραγόντων και πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και της φλεγμονής μέσω σύνδεσης με τον TRAF2 και τον RIPK1 και την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF $\kappa$ B.
- Τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων την διαφοροποίηση και την απόπτωση μέσω σύνδεσης με τον TRAF2.
- Απόπτωση μέσω της δέσμευσης του FADD ( fas associating protein with death domain) και την ενεργοποίηση των κασπασών ( Olivier Micheau et al, 2003).
- Νέκρωση του κυττάρου με ανεξάρτητο των κασπασών μηχανισμό, μέσω NADPH οξειδασών (You-Sun Kim et al, 2007).

Η απορρύθμιση του TNF- $\alpha$  έχει δειχθεί πως σχετίζεται με πολλά αυτοάνοσα, όπως διαβήτη, οστεοπόρωση, ρευματοειδή αρθρίτιδα αλλά και με τις ΙΦΝΕ προκαλώντας συνεχή απόκριση του ανοσοποιητικού με αποτέλεσμα να προκαλεί χρόνια φλεγμονή (Guoqing Chen et al, 2002). Βάση του ρόλου του TNF- $\alpha$  στα αυτοάνοσα νοσήματα, έγιναν έρευνες με σκοπό την εύρεση θεραπείας που να στοχεύει και να δεσμεύει τον TNF- $\alpha$  δημιουργώντας έτσι τους αντι-TNF $\alpha$  βιολογικούς παράγοντες (Marc Feldmann et al, 2005).

### 1.8.2 Αντι-TNF $\alpha$ βιολογικοί παράγοντες

Οι αντι-TNF $\alpha$  βιολογικοί παράγοντες είναι μονοκλωνικά αντισώματα που έχουν μεγάλη ειδικότητα ως προς τον TNF- $\alpha$  και έχουν κάνει επαναστατική είσοδο στον τομέα της θεραπείας (Knight DM et al, 1993). Υπάρχουν πολλοί βιολογικοί παράγοντες όπως το Adalimumab, το Infliximab, το Etanercept που χορηγούνται σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα, όμως συγκεκριμένα για τις ΙΦΝΕ χορηγούνται το Adalimumab και το Infliximab (Kokona Chatzantoni et al, 2006). Υπάρχει και ένα τρίτο, το Certolizumab pegol το οποίο έχει άδεια χρήσης στην Αμερική αλλά όχι στην Ευρώπη. Όσον αφορά στο Adalimumab, είναι ένα εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα ενώ το infliximab είναι χειμερικό μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού και ανθρώπου. Και τα δύο έχουν στόχο την δέσμευση του διαλυτού, διαμεμβρανικού και συνδεδεμένου στους υποδοχείς του TNF $\alpha$  όπως φαίνεται στην εικόνα 2 (John K Triantafillidis et al, 2011). Ειδικά το infliximab έχει πάρα πολύ καλή απόκριση στους ασθενείς με ΙΦΝΕ, όπου ένα 70% των ασθενών ανταποκρίνεται θετικά στην θεραπεία (Rutgeerts P et al, 2009). Συγκεκριμένα παρατηρείται επούλωση της βλενογόννου στο έντερο, προστασία των επιθυλιακών κυττάρων του εντέρου από απόπτωση (Yuan Guo et al, 2013) αλλά και την επούλωση των συρριγίων με αποτέλεσμα την μείωση της εισαγωγής των ασθενών σε νοσοκομεία αλλά και την ανάγκης για χειρουργική επέμβαση (Gary R. Lichtenstein et al, 2005).



D'après Weir N et al. Therapy 2006;3:535-45

Εικόνα 4: Σε αυτή την εικόνα παρουσιάζονται τέσσερις, ευρέως γνωστοί βιολογικοί παράγοντες οι οποίοι λαμβάνονται από ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα. Για τις ΙΦΝΕ χορηγούνται το Infliximab και το Adalimumab. Επίσης χορηγείται και το Certolizumab pegol, το οποίο έχει άδεια κυκλοφορίας μόνο στην Αμερική. Το Etanercept χορηγείται στην ρευματοειδή αρθρίτιδα στην ψωρίαση και στην αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα. Με το ανοιχτό πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι σταθερές αλυσίδες των αντισωμάτων, οι οποίες είναι εξ ολοκλήρου από άνθρωπο, με σκούρο πράσινο ή πορτοκαλί είναι οι μεταβλητές περιοχές σύνδεσης του TNFα, είτε είναι από άνθρωπο είτε από ποντίκι αντίστοιχα. Το etanercept δεν είναι μονοκλωνικό αντίσωμα αλλά ανασυνδιασμένος υποδοχέας για τον TNFα και με το χρώμα μωβ, φαίνεται ο υποδοχέας. (D'après Weir N et al, 2006)

## 1.9 Νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις

Τα τελευταία χρόνια την είσοδο τους στον χώρο της θεραπείας των ΙΦΝΕ έκαναν τα φάρμακα που στοχεύουν σε άλλα μόρια πέραν του TNF. Το Natalizumab το οποίο εγκρίθηκε ως θεραπεία για την Crohn το 2008, είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο αναστέλει τις ιντεγκρίνες και συγκεκριμένα τις  $\alpha_4\beta_1$  και  $\alpha_4\beta_7$  εμποδίζοντας έτσι την μετανάστευση των λευκοκυττάρων. Η θεραπεία αυτή εμφάνιζε σε πολλούς ασθενείς προϊούσα πολυεστιακή λευκοεγκεφαλοπάθεια. Το Vedolizumab σχεδιάστηκε ώστε να έχει μεγάλη ειδικότητα ως προς την ιντεκρίνη  $\alpha_4\beta_7$  μειώνοντας έτσι την φλεγμονή στο έντερο ( Leah Gilroy et al, 2014). Άλλες θεραπείες περιλαμβάνουν το Ustekinumab, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει στην ιντερλευκίνη-6 και το Tofacitinib το οποίο είναι ένας μη βιολογικός αναστολέας των Janus κινασών (JAKs). Τέλος η χρήση της νανοτεχνολογίας στην θεραπεία είναι ένας πολύ υποσχόμενος τομέας προσπαθώντας να δημιουργήσει φάρμακα που θα πηγαίνουν κατευθείαν στον στόχο τους όπως νανοσωματίδια που θα μεταφέρουν siRNA στην περιοχή της φλεγμονής με αποτέλεσμα την αποσιώπηση γονιδίων (Ole Haagen Nielsen, 2015).

## 1.10 Φαρμακογενετική

Πέραν των φαρμακευτικών μεθόδων και θεραπειών τα τελευταία χρόνια δόθηκε μεγάλη σημασία στην φαρμακογενετική η οποία είναι ένα ακόμα σημαντικό εργαλείο για την καλύτερη κατανόηση και ίαση μιας πληθώρας ασθενειών συμπεριλαμβανομένων και των ΙΦΝΕ. Η φαρμακογενετική είναι η μελέτη της συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών του γονιδιώματος με την απόκριση των ασθενών σε φαρμακευτικές αγωγές. Οι πολυμορφισμοί που μελετώνται είναι συνήθως μονονουκλεοτιδικοί (SNPs) και λειτουργικοί, δηλαδή αυτοί που κωδικοποιούν ένζυμα για τον μεταβολισμό των φαρμάκων ή σε γονίδια που εκφράζουν πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος με αποτέλεσμα να μην μεταβολιστεί το φάρμακο. Ο κάθε ασθενής μπορεί να φέρει κάποιον ή κάποιους πολυμορφισμούς που σχετίζονται με την απόκριση στο φάρμακο, οπότε στόχος της φαρμακογενετικής είναι να φτάσει στην εξατομικευμένη θεραπεία όπου κάθε ασθενής θα λαμβάνει την κατάλληλη θεραπεία βάση των πολυμορφισμών που φέρει το γονιδίωμα του ώστε να οδηγηθεί στην ίαση ή στην όσο το δυνατόν πιο ελεγχόμενη μορφή της ασθένειας αλλά και στην αποφυγή παρενεργειών (Stuart A. Scott, 2011).

### 1.10.1 Φαρμακογενετικές μελέτες σε ασθενείς με ΙΦΝΕ

Όπως για πολλές ασθένειες, έτσι και για τις ΙΦΝΕ υπάρχει μια πληθώρα φαρμακογενετικών μελετών που είτε συσχετίζει πολυμορφισμούς με απόκριση σε θεραπείες είτε αποκλείει την οποιαδήποτε συσχέτιση τους.

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω μια πολύ συχνή αγωγή που λαμβάνουν οι ασθενείς με ΙΦΝΕ είναι η αζαθειοπρίνη (AZA) και η 6-μερκαπτοπουρίνη (6-MP) τα οποία ανήκουν στις θειοπουρίνες και για τον μεταβολισμό τους συμμετέχουν πολλά ένζυμα. Το ένζυμο TMTP (thiouridine methyl-transferase) φαίνεται να παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό αυτών των φαρμάκων και η χαμηλή ή αυξημένη παραγωγή αυτού του ενζύμου επηρεάζει την θεραπεία. Έχουν βρεθεί SNPs σε αυτό το γονίδιο που επηρεάζουν την παραγωγή του ενζύμου, με αποτέλεσμα αυξημένη παραγωγή TMTP να οδηγεί με μυελοτοξικότητα ενώ μικρότερη παραγωγή του ενζύμου, προκαλεί τον μερικό μεταβολισμό του φαρμάκου (Richard B Geary et al, 2005).

Όσον αφορά στην θεραπεία με 5-aminosalicylic acid (5-ASA), βρέθηκε πως οι ασθενείς που λαμβάνουν αυτά τα φάρμακα χωρίζονταν σε αυτούς που κάνουν αργή ακετυλίωση και αυτούς που κάνουν γρήγορη ακετυλίωση. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό είναι κάποιοι πολυμορφισμοί που υπάρχουν στα γονίδια NAT (N-acetyltransferase) τα οποία κατηγοριοποιούνται σε NAT 1 και NAT2. Συγκεκριμένα στο NAT2, υπάρχουν 11 SNPs που σχετίζονται με αργή ακετυλίωση οπότε η ύπαρξη τους προκαλεί μειωμένη δραστηριότητα των φαρμάκων που λαμβάνουν δηλαδή την σουλφασαλαζίνη και η μεσαλαζίνη (Marie Pierik et al, 2006).

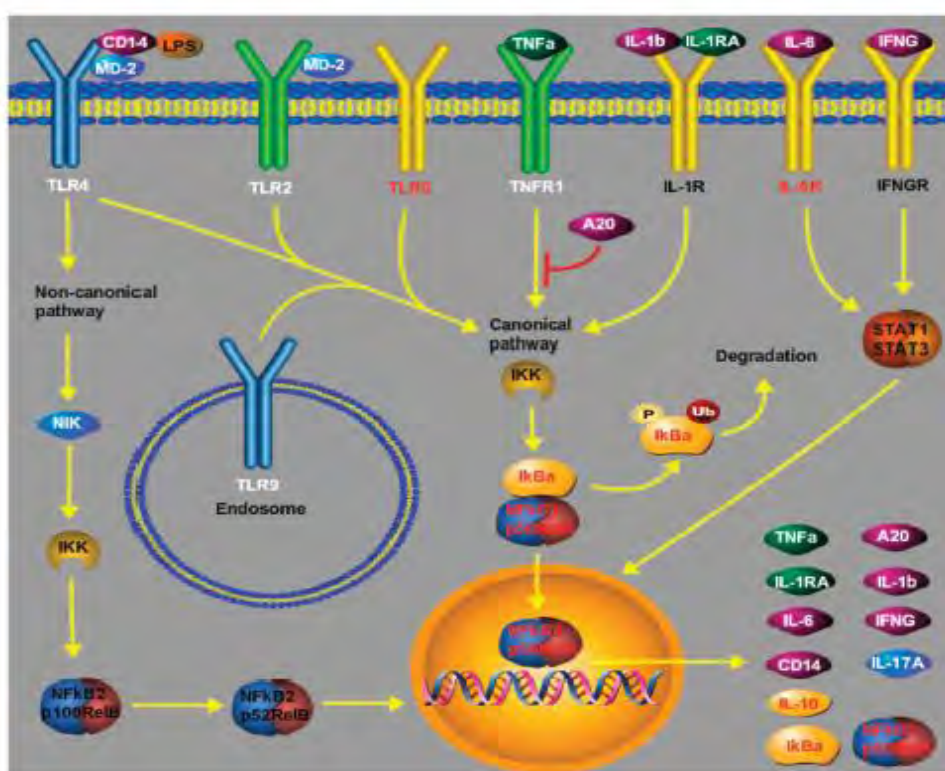
Για τα κορτικοστεροειδή, φαίνεται πως υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του HLA-DR γονιδίου και του μεταβολισμού της βουδενουσίδης (Erameinondas V Tsianos et al, 2011).

Ακόμη φαρμακογενετικές μελέτες έγιναν για τους αντι-TNFα παράγοντες, αναζητώντας πολυμορφισμούς στους υποδοχείς του TNFα, τον TNFR1 και TNFR2. Στον υποδοχέα TNFR2 βρέθηκαν SNPs στο εξώνιο2 και εξώνιο6 τα οποία σχετίζονται με χαμηλή ανταπόκριση στο Infliximab (S Mascheretti et al, 2002).

Στην παρούσα εργασία έγινε μελέτη και του πολυμορφισμού A36G του υποδοχέα TNFR1 με ανταπόκριση στους βιολογικούς παράγοντες, όμως λόγω μη στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων η έρευνα δεν συνεχίστηκε.

Η μεγαλύτερη φαρμακογενετική μελέτη που έγινε για τις ΙΦΝΕ δημοσιεύθηκε το 2014 και έγινε από Δανούς επιστήμονες σε ένα μεγάλο σχετικά δείγμα ασθενών (n=738). Σε αυτή τη μελέτη εξετάστηκαν 39 λειτουργικοί πολυμορφισμοί σε 26 γονίδια. Αποδείχθηκε πως υπάρχουν 19 λειτουργικοί πολυμορφισμοί που συμμετέχουν στο μονοπάτι ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) και συσχετίζονται με ανταπόκριση σε αντι-TNFα θεραπεία σε ασθενείς με ΙΦΝΕ. Αυτοί οι πολυμορφισμοί προκαλούν την συνεχή ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB και την συνεχή δημιουργία κυτταροκινών όπως IL-10, IL-6 και TNFα με αποτέλεσμα την συνεχή φλεγμονή (S.Bank et al, 2014).

Ο μεταγραφικός παράγοντας NFκB ακολουθεί δύο μονοπάτια ενεργοποίησης, το κλασικό μονοπάτι και το εναλλακτικό μονοπάτι ενεργοποίησης τα οποία φαίνονται στην εικόνα 5.



Εικόνα 5: Σε αυτή την εικόνα φαίνεται το κανονικό και το εναλλακτικό μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα NFκB. Το κανονικό μονοπάτι είναι αυτό που μελετήθηκε στην έρευνα των Δανών επιστημόνων και βρέθηκαν 19 λειτουργικοί πολυμορφισμοί που σχετίζονται με ανταπόκριση σε αντι-TNFα θεραπεία ενώ το εναλλακτικό μονοπάτι είναι αυτό που βρίσκεται αριστερά στην εικόνα και οδηγεί επίσης στην ενεργοποίηση του NFκB (S.Bank et al, 2014).

Στο εναλλακτικό μονοπάτι συμμετέχει και η πρωτεΐνη *RANKL* (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) ή *TNFSF11* η οποία συνδέεται με τον διαμεμβρανικό της υποδοχέα *RANK* και μπλοκάρει την TRAF3 οπότε επιτρέπεται η συνέχεια του σήματος και έτσι ο μεταγραφικός παράγοντας ενεργοποιείται όπως φαίνεται στην εικόνα 6 (Deborah Veis Novack, 2011).

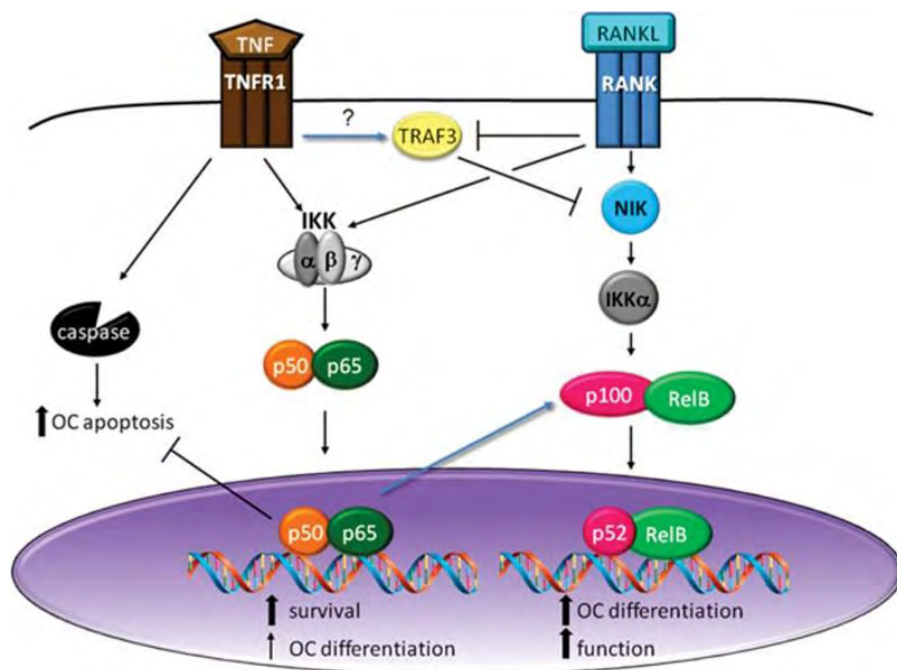
Ο *RANKL* ονομάζεται και *OPG* (Osteoprotegerin) και παίζει μεγάλο ρόλο στη οστεοκλαστογένεση και την οστική πυκνότητα (Simona Mencej et al, 2006).

Εκτός από τον ρόλο του στην οστεοκλαστογένεση ο *RANKL* έχει σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση μέσω της διαφοροποίησης των T και B λεμφοκυττάρων, της επιβίωσης των δενδριτικών κυττάρων και της λειτουργίας των λεμφοειδών οργάνων.

Ο *RANKL* εμφανίζει μεγάλη ομολογία με την πρωτεΐνη CD40 (Cluster of differentiation 40) η οποία παρατηρείται σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίησή τους. Η κυτταροπλασματική περιοχή του *RANKL* περιέχει περιοχές πρόσδεσης για τις πρωτεΐνες TRAF 2, 3, 5, 6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor). Οι πρωτεΐνες TRAF συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB αλλά και των MAPK κινασών. Τα παραπάνω μας οδηγούν στο ότι ο *RANKL* συμμετέχει στα σηματοδοτικά μονοπάτια με παρόμοιο τρόπο αυτού του CD40, δηλαδή συμμετέχοντας στην ωρίμανση και ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων και των T λεμφοκυττάρων ενεργοποιώντας έτσι την ανοσοαπόκριση. Τα δενδριτικά κύτταρα ωριμάζουν και διαφοροποιούνται σε υπότυπους όπου και ανάλογα συμμετέχουν στην ανοσοαπόκριση. Τα δενδριτικά κύτταρα που βρίσκονται στον βλεννογόνο ιστό του εντέρου φαίνεται πως σχετίζονται με το σηματοδοτικό μονοπάτι του *RANKL*. Στο έντερο υπάρχουν λεμφοειδής ιστοί (Peyer's patches) οι οποίοι ρυθμίζουν την ανοσοαπόκριση σε κοινά βακτήρια και στο φαγητό. Μελέτες έδειξαν πως η *RANKL*, μέσω του σηματοδοτικού της μονοπατιού αυξάνει την έκκριση της IL10, η οποία είναι μια αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη. Ακόμα ο *RANKL* συμμετέχει και στην δημιουργία των δευτερογενών λεμφοειδών οργάνων δηλαδή της σπλήνας, των λεμφαδένων και συγκεκριμένων λεμφοειδών ιστών του εντέρου (Peyer's patches) τα οποία εγκλωβίζουν τα αντιγόνα και έτσι ενεργοποιείται το ανοσοποιητικό. Συγκεκριμένα φαίνεται πως συμμετέχει μέσω ενός πολύπλοκου μονοπατιού στην οργανογένεση των εμβρυικών λεμφοειδών οργάνων. Ακόμα ο *RANKL* συμμετέχει μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών στην δημιουργία θυμικών επιθυλιακών κυττάρων τα οποία είναι απαραίτητα στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων στον θύμο αδένα (Taishin Akiyama et al, 2012).

Σε αυτή την έρευνα μελετάται ο λειτουργικός πολυμορφισμός -290 T/C (rs9525641), ο οποίος βρίσκεται στον υποκινητή του γονιδίου *RANKL*. Ο όρος λειτουργικός πολυμορφισμός σημαίνει πως η ύπαρξη ή όχι του πολυμορφισμού που μελετάται επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου δηλαδή την ποσότητα πρωτεΐνης που παράγεται. Η επιβεβαίωση πως ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός είναι λειτουργικός έγινε *in vitro*, μέσω πειράματος με λουριφεράση όπου τοποθετήθηκε το γονίδιο σε πλασμίδια, αντίστοιχα με τα δύο αλληλόμορφα και φάνηκε πως τα επίπεδα ενεργότητας της λουριφεράσης ήταν διαφορετικά άρα και τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του *RANKL* είναι διαφορετικά, ανάλογα με την ύπαρξη του πολυμορφισμού ή την απώλεια αυτού. Συγκεκριμένα η ύπαρξη

του αλληλομόρφου T έδειξε αυξημένη ενεργότητα της λουσιφεράσης οπότε συνεπάγεται πως θα είναι αυξημένα και τα επίπεδα έκφρασης του NFκB (Wenfeng Tan et al, 2010).



Εικόνα 6: Σε αυτή την εικόνα παρατηρείται ο τρόπος δράσης ενεργοποίησης του εναλλακτικού μονοπατιού του μεταγραφικού παράγοντα *NFκB*. Η σύνδεση της *RANKL* με τον υποδοχέα της εμποδίζει την *TRAF3*, η οποία θα έπρεπε να εμποδίσει την κινάση *NIK*, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται το εναλλακτικό μονοπάτι του *NFκB* (Novack DV, 2011)

### 1.11 Σκοπός

Η παρούσα φαρμακογενετική μελέτη έχει ως στόχο την μελέτη του λειτουργικού πολυμορφισμού -290 T/C (rs9525641) ο οποίος βρίσκεται στον υποκινητή του γονιδίου *RANKL* και τη συσχέτιση του με την ανταπόκριση των ασθενών σε αντι-TNFα βιολογικούς παράγοντες (Adalimumab, infliximab), σε ασθενείς που πάσχουν από ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου.



## 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Δείγματα ασθενών

Στην μελέτη συμμετείχαν 52 ασθενείς με νόσο του Crohn ή ελκώδη κολίτιδα, οι οποίοι έχουν λάβει θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες (Infliximab και Adalimumab). Από κάθε ασθενή έγινε λήψη περιφερικού αίματος που τοποθετήθηκε σε ειδικά σωληνάρια μαζί με αντιπηκτικό EDTA και το οποίο φυλάχθηκε στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Τα δείγματα προέρχονται από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, το «Βενιζέλιο-Πανάνειο» Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου και το Τζάνειο Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο Πειραιά

### 2.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από περιφερικό αίμα

Η διαδικασία αυτή δίνει την δυνατότητα απομόνωσης του γονιδιωματικού DNA των ασθενών από τα ερυθροκύτταρα του αίματος το οποίο στην συνέχεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μοριακές μελέτες. Η προσεκτική εφαρμογή των βημάτων της διαδικασίας εξασφαλίζει την καθαρότητα και την αποφυγή θρυμματισμού του DNA.

#### Διαδικασία απομόνωσης

Αρχικά ξεπαγώνουν τα δείγματα αίματος, γίνεται λήψη 0,5ml και μεταφορά σε erpendorf, προσθήκη 1 ml διαλύματος SSC, ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 3 min. Με προσοχή αφαιρείτε το SSC και επαναλαμβάνεται η διαδικασία. Ακολουθεί προσθήκη 50 μl SDS 5%, 500 μl 0.2M οξικού νάτριου και 10 μl πρωτεΐνάση K (10mg/ml), πραγματοποιείται ανάδευση vortex, και επώαση για μία 1h στους  $55^{\circ}\text{C}$  με συχνή ανάδευση του δείγματος. Το SDS διασπά τις κυτταρικές μεμβράνες με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται το DNA, ενώ η πρωτεΐνάση K διασπά τις πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων των νουκλεασών οι οποίες μπορεί να καταστρέψουν το DNA κατά την απομόνωση.

Στην συνέχεια προστίθενται 0.5 ml φαινόλης, 0.5 ml χλωροφόρμιο/ισοαμυλικής αλκοόλης(24:1) και μετά από έντονη ανάδευση , ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min στις 13000 rpm, στους  $4^{\circ}\text{C}$ .

Μετά την φυγοκέντρηση δημιουργούνται τρεις φάσεις, εκ των οποίων η κάτω είναι η οργανική και η πάνω η υδατική. Γίνεται συλλογή της υδατικής φάσης και μεταφορά σε νέο erpendorf όπου προστίθενται 1ml χλωροφόρμιο/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στους  $4^{\circ}\text{C}$  στις 13000 rpm. Επαναλαμβάνεται η προηγούμενη διαδικασία συλλογής της υπερκείμενης υδατικής φάσης στην οποία προστίθεται 1ml παγωμένης ισοπροπανόλης. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για 20 min ή ολονύκτια ώστε να πραγματοποιηθεί η κατακρήμνιση του DNA.

Η συλλογή του DNA γίνεται με φυγοκέντρηση για 20 min στους  $-4^{\circ}\text{C}$  στις 13000 rpm. Αφού αφαιρεθεί η ισοπροπανόλη, προστίθεται 1ml παγωμένης αιθανόλης 70% και γίνεται φυγοκέντρηση στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 5 min στις 13000 rpm. Αφαιρείτε όλη η ποσότητα αλκοόλης και ακολουθεί ξήρανση του DNA με επώαση στους  $37^{\circ}\text{C}$  (περίπου 1h). Τέλος γίνεται η

επαναδιάλυση του DNA με προσθήκη 100μl ddH<sub>2</sub>O και επώαση στους 55°C για 1h. Το DNA φυλάσσεται στους 4°C για άμεση χρήση ή στους -20°C για μελλοντική χρήση.

#### Διαλύματα:

- **SSC 20x** (0.15M NaCl, 0.015M sodium citrate, pH 7)  
Από αυτό το διάλυμα γίνεται αραίωση 1/20 για την παρασκευή SSC 1x
- **3M οξικό νάτριο**(CH<sub>3</sub>COONa)  
Από αυτό το διάλυμα γίνεται αραίωση για την παρασκευή 2M οξικό νάτριο .
- **SDS 10%**  
Από αυτό το διάλυμα γίνεται αραίωση για την παρασκευή SDS 5%
- **Πρωτεΐνάση K** (10mg/ml)
- **Χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη** (24:1 v/v)
- **Διάλυμα φαινόλης**
- **Διάλυμα ισοπροπανόλης**
- **Διάλυμα αιθανόλης 70%**

### 2.3 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του DNA

Μετά την διαδικασία της απομόνωσης, ακολούθησε η διαδικασία της φωτομέτρησης για ποσοτικό προσδιορισμό και η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%, για ποιοτικό.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό έγινε χρήση φωτόμετρου το οποίο εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία, στα 260 nm. Αφού πρώτα γίνει αραίωση του δείγματος 1/50 (1μl DNA και 49μl ddH<sub>2</sub>O), τοποθετείτε σε ειδικό erpendorf μέσα από το οποίο περνάει η υπεριώδης ακτινοβολία και καταλήγει στον φωτοανιχνευτή που μετράει την ακτινοβολία που διαπέρασε το δείγμα. Το DNA απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία οπότε όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση, τόσο περισσότερη ποσότητα DNA υπάρχει στο δείγμα.

Για τον ποιοτικό έλεγχο του απομονωμένου DNA, δηλαδή η ύπαρξη του αλλά και το κατά πόσο είναι ενιαίο ή σε θραύσματα έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%. Η πηκτή αγαρόζης, παρασκευάζεται λιώνοντας, αρχικά την αγαρόζη μέσα σε διάλυμα TAE 1X και ύστερα ενώ το μείγμα είναι ακόμα σε υγρή μορφή, γίνεται προσθήκη του βρωμιούχου αιθιδίου και έντονη ανάδευση για να ενωθεί με το μείγμα. Συγκεκριμένα για 1% πηκτή αγαρόζης χρειάστηκαν 50ml TAE 1X, 0.5gr αγαρόζης και 5μl βρωμιούχο αιθίδιο. Έπειτα το μείγμα μπαίνει σε ένα καλούπι και με την τοποθέτηση μίας “χτένας “ δημιουργούνται πηγαδάκια στα οποία αργότερα θα τοποθετηθεί το DNA. Αφού πήξει το μείγμα και αφαιρεθεί η χτένα, η πηκτή μπαίνει στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιέχει ένα θετικό και ένα αρνητικό ηλεκτρόδιο. Πρέπει η πηκτή να είναι καλυμμένη με το ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X και τότε να ‘φορτωθούν’ στα πηγαδάκια τα δείγματα, τα οποία περιέχουν 3μl DNA και 2μl χρωστικής (loading buffer), η οποία βοηθάει το δείγμα να καθιζάνει στα πηγαδάκια. Έπειτα ορίζετε η τάση στα 100 volt για 20 min περίπου.

Το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο οπότε κατά την ηλεκτροφόρηση θα φύγει από τα πηγαδάκια και θα πάει προς τον θετικό πόλο. Όσο πιο γρήγορα κινηθεί το DNA στην πηκτή τόσο πιο μικρό μέγεθος έχει και αντίστροφα.

Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια ουσία που έχει την ιδιότητα να παρεμβάλετε στις βάσεις του DNA και να φθορίζει σε UV ακτινοβολία και έτσι κάνει το DNA ορατό. Αυτή η ιδιότητα του αιθιδίου να προσδένεται στο DNA την κάνει καρκινογόνο και χρήζει προσοχής. Αφού τοποθετηθεί η πηκτή στην συσκευή UV, φθορίζει το αιθίδιο και φαίνετε αν υπάρχει DNA και αν είναι θρυμματισμένο.

#### **Υλικά:**

- TAE 50X: Tris Base 2M  
Οξικό οξύ  
EDTA 0,05M  
Από αυτό διάλυμα έγινε αραιώση για την παρασκευή TAE 1X.
- Loading buffer
- Αγαρόζη
- Βρωμιούχο αιθίδιο

## 2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, polymerase chain reaction) είναι μια τεχνική κατά την οποία μπορεί να πολλαπλασιαστεί, με εκθετικό ρυθμό, μια συγκεκριμένη αλληλουχία από ολόκληρο το γονιδίωμα κάνοντας έτσι πιο εύκολη και πιο ειδική την μελέτη συγκεκριμένων αλληλουχιών.

Αρχικά γίνεται η προετοιμασία της αντίδρασης μέσα στα pcr tubes όπου τοποθετείτε το DNA, ένα ζευγάρι εκκινητών με αλληλουχία συμπληρωματική ως προς την αλληλουχία στόχο, δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPS), ρυθμιστικό διάλυμα (buffer),  $MgCl_2$  και μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (Taq polymerase). Η προετοιμασία των δειγμάτων είναι καλό να γίνεται μέσα σε πάγο ώστε τα αντιδραστήρια να μην αρχίσουν να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους πριν μπουν στην συσκευή (θερμοκυκλοποιητής).

Το πρώτο στάδιο είναι η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA με αύξηση της θερμοκρασίας περίπου στους  $95^{\circ}C$ , αφήνοντας το μονόκλωνο. Το δεύτερο στάδιο είναι η υβριδοποίηση των εκκινητών στην μονόκλωνη μήτρα, βάση της συμπληρωματικότητας και σε αυτό το στάδιο η θερμοκρασία πρέπει να πέσει περίπου στους  $60^{\circ}C$ . Η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών είναι συγκεκριμένη για κάθε πείραμα και μπορεί να βρεθεί μέσω της pcr gradient, δηλαδή μια αντίδραση πολυμεράσης κατά την οποία, κρατώντας όλες τις συνθήκες της αντίδρασης σταθερές, αλλάζει μόνο η θερμοκρασία υβριδισμού εκκινητών για να βρεθεί που δουλεύει καλύτερα.

Το τρίτο στάδιο είναι η επιμήκυνση των εκκινητών όπου η πολυμεράση τοποθετεί με κατεύθυνση 5' προς 3' τα νουκλεοτίδια δημιουργώντας έτσι αντίγραφα της επιθυμητής αλληλουχίας.

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για 25-40 κύκλους.

### Υλικά:

- **Μήτρα-DNA** : Είναι το κομμάτι του DNA που περιλαμβάνει την επιθυμητή αλληλουχία.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer)**: Το buffer ρυθμίζει τις συνθήκες του pH στην αντίδραση, βοηθώντας έτσι το ένζυμο να δουλέψει καλύτερα.
- **$MgCl_2$** : Το χλωριούχο μαγνήσιο υποβοηθάει την δράση της πολυμεράσης αλλά λάθος ποσότητα μπορεί να καταστρέψει την αντίδραση. Σε πολλά buffer εμπεριέχετε το  $MgCl_2$ .
- **dNTPS**: Τα dNTPS αποτελούνται από dATP , dTTP , dGTP , dCTP και είναι απαραίτητα για την δημιουργία της νέας αλυσίδας.
- **Εμπρόσθιος και ανάστροφος εκκινητής**: Οι εκκινητές είναι αλληλουχίες συμπληρωματικές της αλληλουχίας στόχου και μετά την πρόσδεση τους, ξεκινάει η επιμήκυνση.
- **Taq Πολυμεράση**: Είναι μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση η οποία έχει απομονωθεί από το βακτήριο *thermus aquaticus*. Αυτό το ένζυμο τοποθετεί τα

νουκλεοτίδια στην αντίστοιχη συμπληρωματική της θέση και έτσι δημιουργείται η νέα αλυσίδα.

Σε αυτή την εργασία έγινε ενίσχυση κομματιού 550bp για να μελετηθεί ο πολυμορφισμός T → C με rs 9525641 που βρίσκεται στο γονίδιο *TNFSF11*.

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται οι συνθήκες και τα αντιδραστήρια:

Πίνακας 1: Οι παρακάτω συνθήκες επαναλήφθηκαν για 37 κύκλους με το ακόλουθο ζεύγος εκκινητών :

**F: 5'-GGGAGAGGTTGGACAGGA-3'**

**R: 5'-CTCCCTCCCCTTCTGTCTG-3'.**

Συνθήκες PCR	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95° C	10 min
Αποδιάταξη	95° C	45 sec
Υβριδισμός	61° C	45 sec
Επέκταση	72° C	45 sec
Τελική επέκταση	72° C	7 min

Πίνακας 2: Σε αυτό τον πίνακα παρουσιάζονται οι ποσότητες και οι συγκεντρώσεις από τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση pcr.

Αντιδραστήρια PCR	Ποσότητες (μl)
Buffer (1,5mM MgCl <sub>2</sub> )	2.5 μl
DNTPs	0.5 μl
Forward (50pmol/ml)	0.5 μl
Reverse (50pmol/ml)	0.5 μl
ddH <sub>2</sub> O	19.9 μl
Taq Polymerase	0.1 μl
DNA (αραιωμένο 1/10)	1.0 μl
Συνολικός όγκος Αντίδρασης	25.0 μl

Στα προϊόντα της αντίδρασης έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% για να επιβεβαιωθεί ο πολλαπλασιασμός της αλληλουχίας που μελετάται. Σε αυτή την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε σε ένα από τα πηγαδάκια ένας ladder μοριακού βάρους ώστε να φανεί εάν το κομμάτι που πολλαπλασιάστηκε έχει το επιθυμητό μοριακό βάρος. Στην παρούσα μελέτη η επιθυμητή μπάντα που φέρει τον πολυμορφισμό rs9525641 τον οποίο μελετάμε, είναι στις 550bp. Τα προϊόντα της αντίδρασης φυλάσσονται στους -20°C.

## 2.5 Πέψη με περιοριστικό ένζυμο

Στην μελέτη που έγινε για τον πολυμορφισμό *TNFR1* A36G του υποδοχέα του *TNFα* η οποία δεν συνεχίστηκε διότι δεν κατέληγε σε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της πέψης με περιοριστικό ένζυμο. Τα περιοριστικά ένζυμα έχουν την δυνατότητα να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες και να κόβουν εκεί, αφήνοντας τυφλά ή κολλώδη άκρα. Γι αυτό το πολυμορφισμό χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *MspA1I* το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία CCGCTG και αφήνει τυφλά άκρα. Εάν σε αυτή τη θέση υπάρχει A τότε δεν θα το κόψει γιατί το ένζυμο αναγνωρίζει όπου υπάρχει G δηλαδή ο πολυμορφισμός και κόβει αφήνοντας ένα κομμάτι DNA 75bp και ένα κομμάτι 108 bp. Η διαδικασία της πέψης γίνεται με ολονύκτια επώαση του δείγματος στους 37°C. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε 1 μl Buffer B, 0.3 μl ένζυμο, 5 μl pcr προϊόν και 3.7 μl ddH<sub>2</sub>O.

## 2.6 Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης-ουρίας

Για τον διαχωρισμό των μορίων βάση μεγέθους χρησιμοποιείται η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης-ουρίας. Με αυτή την τεχνική μπορούν να ανιχνευτούν μόρια με βάρος 2-500bp και διαφορές μεταξύ μορίων ακόμα και ενός νουκλεοτιδίου. Το κομμάτι DNA του *TNFR1* που μελετήθηκε είναι 183 bp και η πηκτή είχε συγκέντρωση 6% διότι όσο πιο μικρό το κομμάτι τόσο μεγαλύτερη θα πρέπει να είναι η συγκέντρωση της πηκτής.

### Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης-ουρίας 6%

Πρώτα πρέπει να συναρμολογηθεί η συσκευή ηλεκτροφόρησης η οποία αποτελείται από δύο γυάλινες πλάκες που τις χωρίζει ένα διαχωριστικό (1.5-2.0mm). Για την παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης 6%, όγκου 62.5ml ακολουθείται η εξής διαδικασία:

Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμινώνονται:

- 6gr ουρίας
- 12.5ml διάλυμα ακρυλαμίδης 30%

- 6.25ml TBE 10X
- 50ml ddH<sub>2</sub>O

Ακολουθεί διήθηση και προσθήκη ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 62.5ml. Το διάλυμα μεταφέρεται σε κωνική φιάλη και στη συνέχεια προστίθενται 62.5ml TEMED και 375ml APS 20%. Το διάλυμα ρίχνεται ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες και στη κορυφή τοποθετούνται τα χτενάκια. Ο πολυμερισμός χρειάζεται περίπου 30 min έως ότου ολοκληρωθεί. Στη συνέχεια αφαιρούνται τα χτενάκια και οι γυάλινες πλάκες τοποθετούνται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης στη οποία προστίθεται TBE 1X. Τα προϊόντα της πέψης και ο μάρτυρας μοριακού βάρους φορτώνονται στα πηγαδάκια. Εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση 230V για περίπου 2-2.5 h. Ακολουθεί χρώση με νιτρικό άργυρο της πηκτής ακρυλαμίδης για να φανούν τα αποτελέσματα.

### **Χρώση με νιτρικό άργυρο**

Η διαδικασία της χρώσης με νιτρικό άργυρο είναι η παρακάτω:

Γίνονται δύο πλύσεις (200ml η κάθε μία) με οξικό οξύ (CH<sub>3</sub>COOH) των 3 min η καθεμία. Το διάλυμα οξικού οξέος αποτελείται από 0.5ml CH<sub>3</sub>COOH/ 400ml H<sub>2</sub>O.

- 1 πλύση των 10 min με 200ml νιτρικό άργυρο (AgNO<sub>3</sub>) (1gr νιτρικό άργυρο/L H<sub>2</sub>O).
- 2 ξεπλύματα με H<sub>2</sub>O.
- 1 πλύση με διάλυμα:  
3gr NaOH  
Βοροϋδρίδιο του νατρίου  
1ml φορμαλδεύδη  
200ml H<sub>2</sub>O
- Ξέπλυμα με νερό για 1 min.

### **2.7 Αλληλούχηση (Sequencing)**

Αφού πρώτα έγινε καθαρισμός των προϊόντων της PCR, με την χρήση κιτ καθαρισμού της Invitrogen (PureLink™-Quick PCR, Purification Kit) ώστε να απομακρυνθούν εκκινητές, νουκλεοτίδια, πολυμεράση και οτιδήποτε άλλο μπορεί να δημιουργήσει πρόβλημα στην αλληλούχηση, ακολούθησε η τοποθέτηση των δειγμάτων σε ειδικό plate. Έπειτα τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχηση με τον ανάστροφο εκκινητή.

## 2.8 Στατιστική ανάλυση

Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε ανταποκριθέντες και μη ανταποκριθέντες στην θεραπεία με αντι-TNFs αλλά και βάση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης ομαδοποιήθηκαν και ως ομοζυγώτες και ετεροζυγώτες στον πολυμορφισμό -290 T/C.

Με την χρήση διαφόρων τεστ υπολογίστηκε η συχνότητα εμφάνισης του κοινού αλληλομόρφου και επίσης έγινε δοκιμή της ισορροπίας Hardy-Weinberg. Ακόμα έγινε το τεστ Cochran-Armitage για την συσχέτιση του πολυμορφισμού με την απόκριση των ασθενών στην θεραπεία αλλά και τεστ που δείχνουν την επικρατή ή υπολειπόμενη δράση του κοινού αλληλομόρφου T. Για την στατιστική ανάλυση το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο  $P < 0.05$



### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη έλαβαν μέρος 52 ασθενείς με νόσο του Crohn (86.5%) και ελκώδη κολίτιδα (13.5%) που λάμβαναν αντι-TNF θεραπεία για τουλάχιστον 24 μήνες. Η ανταπόκριση στη θεραπεία εκτιμήθηκε βάσει της μεταβολής του δείκτη βαρύτητας (CDAI) ως εξής: (CDAI) τιμή < ή=150 μονάδες) και κλινική ανταπόκριση (μείωση του CDAI) > ή =100 μονάδες) σε ασθενείς που είχαν αρχικό CDAI τιμή > ή =220. Οι αντι-TNF παράγοντες που λάμβαναν οι ασθενείς της παρούσας μελέτης είναι το Infliximab και το Adalimumab. Έγινε γονοτύπηση των ασθενών για τον πολυμορφισμό -290T/C (rs9525641) που βρίσκεται στον υποκινητή του γονιδίου RANKL.

#### 3.1 Ασθενείς

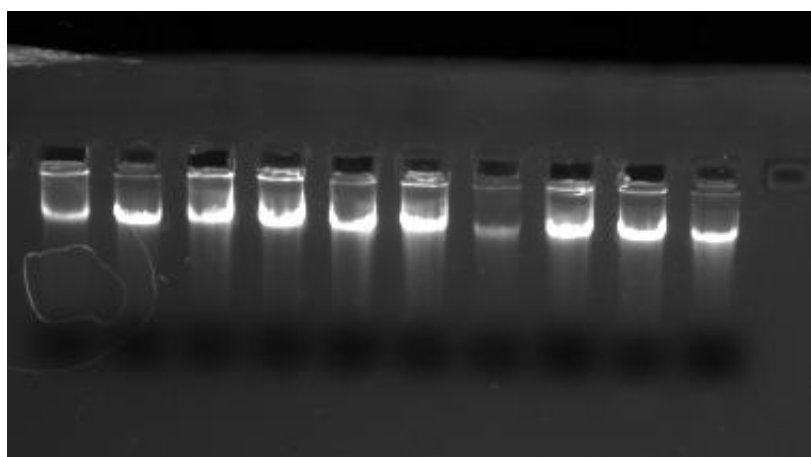
Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΙΦΝΕ που συμμετείχαν σε αυτή την μελέτη παραθέτονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Σε αυτό τον πίνακα παραθέτονται τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που συμμετείχαν σε αυτή την έρευνα.

ΜΕΤΑΒΛΗΤΗ	ΤΙΜΗ
ΗΛΙΚΙΑ (σε έτη), Μ.Ο ± ΤΑ*	43 ± 15.33
ΦΥΛΟ (Α/Θ)	29/23
ΧΡΟΝΟΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ, Μ.Ο ± ΤΑ*	6.54 ± 3.1
ΗΛΙΚΙΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ, Μ.Ο ± ΤΑ*	39 ± 11.25
Αρχικό CDAI ΜΟ±ΤΑ	171.14 ± 114.17
CDAI ΜΕΤΑ ΑΠΟ 24 ΜΗΝΕΣ, Μ.Ο ± ΤΑ*	48.57 ± 47.82
ΠΟΣΟΣΤΟ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΘΕΝΤΩΝ	56%
ΠΟΣΟΣΤΟ ΜΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΘΕΝΤΩΝ	44%

### 3.2 Αποτελέσματα απομόνωσης DNA από αίμα.

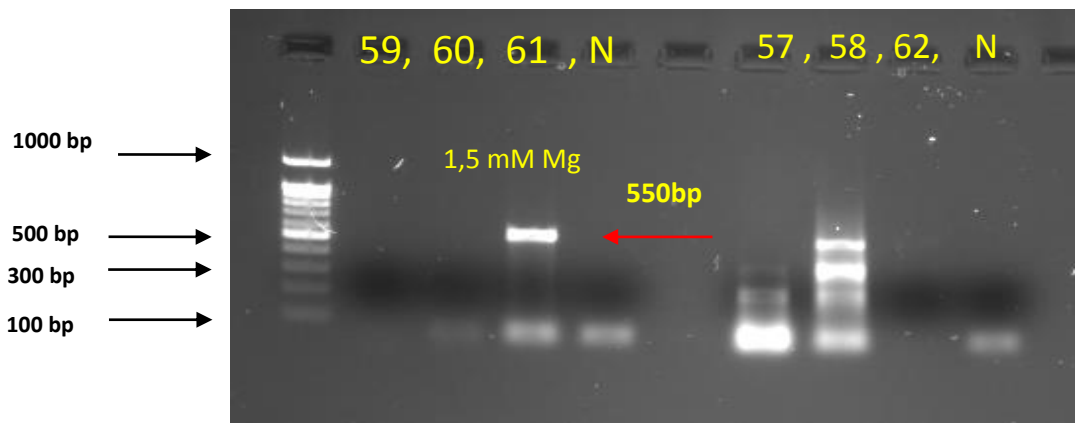
Σε όλους τους ασθενείς έγινε απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα και έπειτα έγινε ηλεκτροφόρηση αυτού σε gel αγαρόζης 1%. Μετά από έκθεση του gel σε UV ακτινοβολία οπτικοποιήθηκαν τα αποτελέσματα, όπως φαίνονται στην εικόνα 7. Σε αυτή την εικόνα φαίνεται πως η απομόνωση έγινε επιτυχώς και πως το DNA είναι αρκετό και ποιοτικό για να το χρησιμοποιήσουμε σε περαιτέρω πειράματα. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για όλα τα δείγματα.



Εικόνα 7: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης γενωμικού DNA σε gel αγαρόζης 1%, μετά από απομόνωση DNA από αίμα.

### 3.3 Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με διαβαθμίσεις (PCR gradient)

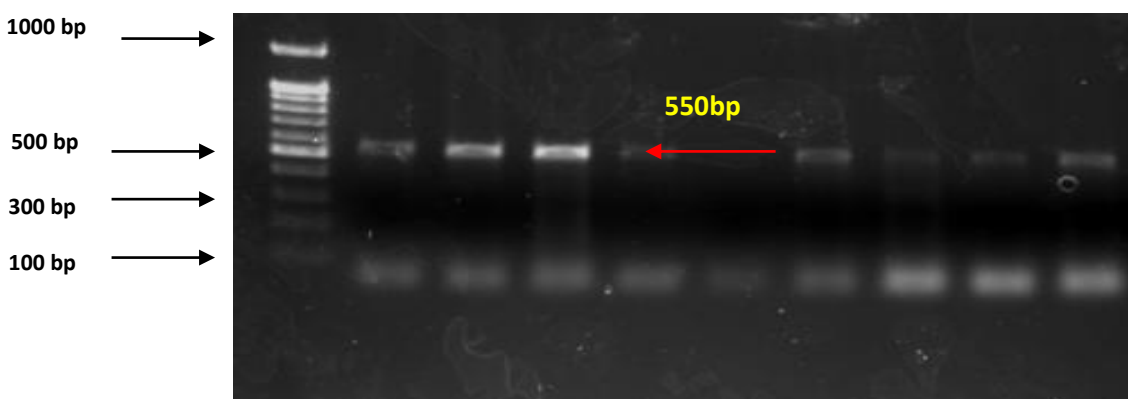
Για να βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας υβριδισμού εκκινητών αλλά και συγκέντρωσης μαγνησίου κάτω από τις οποίες θα γίνει ο πολλαπλασιασμός του τμήματος του γονιδίου *RANKL* που μελετάται, πραγματοποιήθηκε PCR με διαβαθμίσεις όπου δοκιμάστηκαν διάφορες θερμοκρασίες υβριδισμού εκκινητών και δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις μαγνησίου. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 8, όπου προέρχεται από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Φαίνεται πως στους 61°C θερμοκρασίας υβριδισμού εκκινητών και με συγκέντρωση 1.5mM μαγνήσιο πολλαπλασιάστηκε με επιτυχία το επιθυμητό κομμάτι του γονιδίου το οποίο έχει μοριακό βάρος 550 όπως φαίνεται από τον δείκτη μοριακών βαρών (ladder). Όλες οι άλλες συνθήκες φαίνεται πως δίνουν είτε παραπροϊόντα είτε κανένα προϊόν.



Εικόνα 8: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR gradient σε gel αγαρόζης 2%.

### 3.4 Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

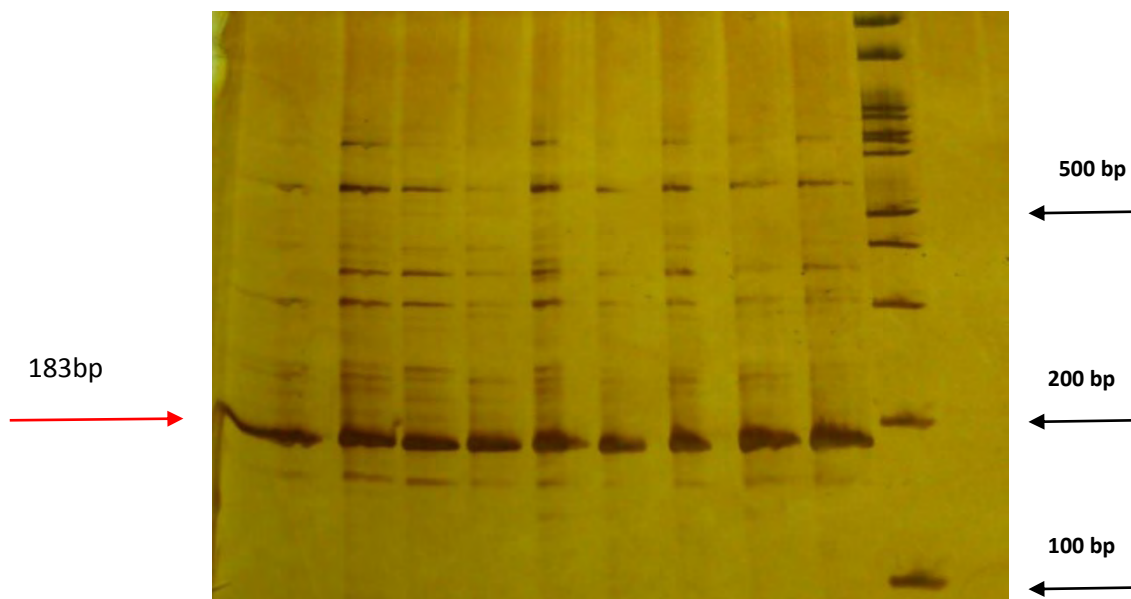
Εφόσον έχουν βρεθεί οι κατάλληλες συνθήκες για τον πολλαπλασιασμό του κομματιού του γονιδίου *RANKL* με μοριακό βάρος 550 bp, το οποίο φέρει τον πολυμορφισμό -290T/C (rs9525641), ακολούθησε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 9, όπου το επιθυμητό κομμάτι έχει πολλαπλασιαστεί και επιβεβαιώνεται από τον δείκτη μοριακών βαρών (ladder).



Εικόνα 9: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR σε gel αγαρόζης 2%.

### 3.5 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 6%.

Όσον αφορά στην μελέτη του πολυμορφισμού *TNFR1 A36G* του υποδοχέα του TNFα του οποίου η μελέτη δεν συνεχίστηκε λόγω μη στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων, αφού έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 6% για 2h και μετά την χρώση με νιτρικό άργυρο πάρθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα τα οποία φαίνονται στην εικόνα 10, όπου παρατηρείτε πως κανένα από τα προϊόντα της pcr δεν κόπηκε μετά την πέψη γιατί όλα έχουν μοριακό βάρος 183bp δηλαδή όσο και το άκοπο τμήμα, οπότε δεν υπάρχει ο πολυμορφισμός που μελετάται.



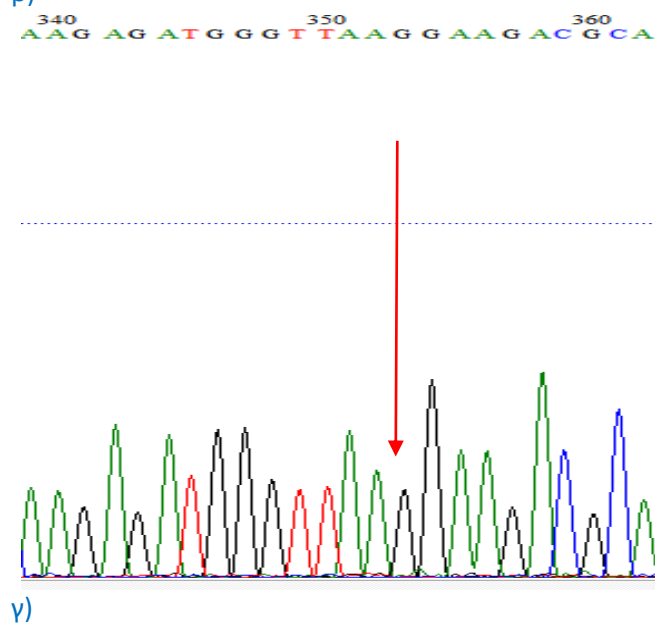
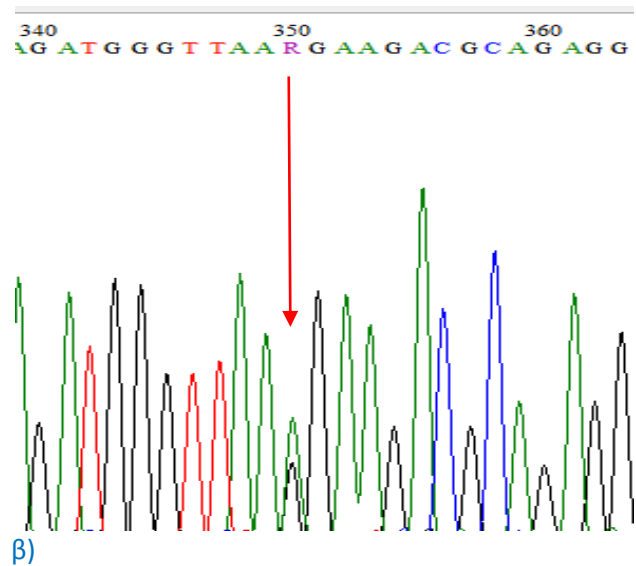
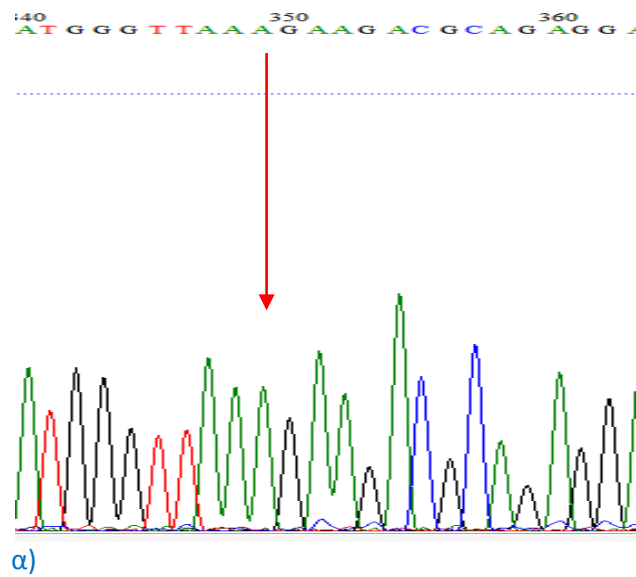
Εικόνα 10: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της πέψης σε gel πολυακρυλαμίδης 6% και χρώσης του gel με νιτρικό άργυρο για οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

### 3.6 Αλληλούχηση

Τα προϊόντα της PCR μετά από καθαρισμό στάλθηκαν για αλληλούχηση. Μέσω αυτής της διαδικασίας είναι δυνατόν να διαβαστεί η νουκλεοτιδική αλληλουχία του κομματιού που έχει ενισχυθεί με αποτέλεσμα να φάνει η ύπαρξη του πολυμορφισμού.

Τα αποτελέσματα είναι σε μορφή χρωματογραφήματος όπου το κάθε χρώμα αντιστοιχεί σε άλλο νουκλεοτίδιο και οι κορυφές δείχνουν ύπαρξη ομοζυγωτίας ή ετεροζυγωτίας. Στην εικόνα 11, φαίνετε πρώτα ένα δείγμα ομοζυγωτίας για το αλληλόμορφο T (TT). Μετά είναι ένα δείγμα ετεροζυγωτίας (TC) και τέλος, ομοζυγωτία ως προς το αλληλόμορφο C (CC). Ο λόγος που φαίνετε A στο χρωματογράφημα είναι διότι η αλληλούχηση έγινε με τον ανάστροφο εκκινητή.

Εικόνα 11: Αποτελέσματα αλληλούχησης σε μορφή χρωματογραφήματος. Φαίνετε ένα μέρος από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του ενισχυμένου κομματιού του *RANKL*. Στο χρωματογράφημα α φαίνετε με κόκκινο βέλος ένα δείγμα ομοζυγωτίας για το αλληλόμορφο T (TT), στο χρωματογράφημα β φαίνετε ένα δείγμα ετεροζυγωτίας (TC) και στο χρωματογράφημα γ φαίνετε ένα δείγμα ομοζυγωτία ως προς το αλληλόμορφο C (CC).



Εικόνα 11: Αποτελέσματα αλληλούχισης σε μορφή χρωματογραφήματος. Φαίνεται ένα μέρος από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του ενισχυμένου κομματιού του *RANKL*. Στο χρωματογράφημα α φαίνεται με κόκκινο βέλος ένα δείγμα ομοζυγωτίας για το αλληλόμορφο T (TT), στο χρωματογράφημα β φαίνεται ένα δείγμα ετεροζυγωτίας (TC) και στο χρωματογράφημα γ φαίνεται ένα δείγμα ομοζυγωτίας ως προς το αλληλόμορφο C (CC).

### 3.6 Γονοτύπηση

Από τα αποτελέσματα της αλληλούχησης έγινε και ο προσδιορισμός των γονοτύπων όλων των ασθενών, όσον αφορά στον πολυμορφισμό rs9525641 που μελετάται. Οι γονότυποι και ο κωδικός του κάθε ασθενή, με την ανταπόκριση σε κάθε φάρμακο φαίνετε στον παρακάτω πίνακα 4. Όπου υπάρχει το R (Responder) αντιστοιχεί σε ανταποκριθέντες και NR (Non responder) σε μη ανταποκριθέντες ασθενείς στο φάρμακο. Το K υποδεικνύει ότι το δείγμα προήλθε από την Κρήτη (Βενιζέλιο-Πανάνειο νοσοκομείο Ηρακλείου), το A από την Αθήνα (Τζάνειο νοσοκομείο) και το Λ από την Λάρισα (Πανεπιστημιακό νοσοκομείο). Το Ifx είναι ο βιολογικός παράγοντας infliximab και το Hum είναι ο βιολογικός παράγοντας Humira.

Πίνακας 4: Σε αυτό τον πίνακα βλέπουμε τους γονότυπους των ασθενών και την ανταπόκριση τους στην θεραπεία με αντι-TNFα. Επίσης αναγράφεται δίπλα από κάθε ασθενή το φάρμακο το οποίο έλαβε.

Κωδικός ασθενή	Γονότυπος	Κωδικός ασθενή	Γονότυπος	Κωδικός ασθενή	Γονότυπος	Κωδικός ασθενή	Γονότυπος
K1 (Ifx-R)	C/T	K13 (Ifx-R; Hum-NR)	T/T	K25 (Ifx-NR; Hum-R)	T/T	Λ2 (Ifx-R)	C/T
K2 (Ifx-R)	C/T	K14 (Hum-R)	T/T	A32 (Hum-R)	T/T	Λ3 (Ifx-R)	C/T
K3 (Ifx-R)	C/C	K15 (Ifx-R)	C/T	K27 (Ifx-NR)	C/T	A15 (Ifx-R)	C/T
K4 (Hum-R)	T/T	K16 (Ifx-NR)	T/T	K28 (Hum-R)	T/T	Λ5 (Ifx-NR)	T/T
K5 (Ifx-R)	T/T	K17 (Ifx-NR)	C/T	K29 (Hum-R)	C/T	Λ10 (Ifx-R)	C/C
K6 (Ifx-NR)	T/T	K18 (Ifx-NR)	T/T	K30 (Ifx-NR)	T/T	Λ12 (Ifx-R)	C/C
A17 (Ifx-R)	C/C	K19 (Ifx-NR)	C/T	K31 (Ifx-NR; Hum-NR)	T/T	Λ16 (Ifx-R; Hum-NR)	C/T
K8 (Ifx-R)	C/T	K20 (Ifx-NR)	C/C	K32 (Ifx-R)	C/T	Λ17 (Ifx-NR)	C/T

<b>K9</b> (Ifx-NR)	<b>C/T</b>	<b>K21</b> (Ifx-NR)	<b>C/T</b>	<b>K33</b> (Hum-NR)	<b>T/T</b>	<b>Λ18</b> (Ifx-R)	<b>T/T</b>
<b>K10</b> (Ifx-R)	<b>C/T</b>	<b>K22</b> (Ifx-NR; Hum-NR)	<b>C/T</b>	<b>K34</b> -	-	<b>Λ19</b> (Ifx-R)	<b>C/C</b>
<b>K11</b> (Ifx-NR)	<b>T/T</b>	<b>K23</b> (Ifx-R)	<b>C/T</b>	<b>K35</b> (Hum-R)	<b>T/T</b>	<b>Λ25</b> (Ifx-R)	<b>C/T</b>
<b>K12</b> (Ifx-R)	<b>C/T</b>	<b>K24</b> (Ifx-NR)	<b>T/T</b>	<b>Λ1</b> (Ifx-R)	<b>C/T</b>	<b>Λ30</b> (Ifx-NR)	<b>C/C</b>
						<b>Λ31</b> (Hum-R)	<b>T/T</b>

### **3.7 Στατιστική ανάλυση συσχέτισης του πολυμορφισμού -290T/C του γονιδίου *RANKL* με ανταπόκριση στην θεραπεία με αντι-TNFα παράγοντες.**

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης φαίνονται στους πίνακες 5,6 και 7. Η ανάλυση έγινε και για τα δύο φάρμακα μαζί, με τους ασθενείς κατηγοριοποιημένους σε ανταποκριθέντες και μη-ανταποκριθέντες αλλά και για το κάθε φάρμακο ξεχωριστά. Η ανταπόκριση των ασθενών κρίθηκε από τον δείκτη CDAI (Crohn's disease activity index) ο οποίος δείκτης χρησιμοποιείται σε κλινικές μελέτες αλλά χρησιμοποιήθηκε και στην μεγαλύτερη φαρμακογενετική μελέτη (Bank et al, 2014) όσον αφορά στις ΙΦΝΕ. Να σημειωθεί ότι οι ασθενείς έχουν λάβει αντι-TNFα παράγοντες για τουλάχιστον 24 μήνες.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης για όλους στους ασθενείς και για τους δύο αντι-TNFα παράγοντες (Adalimumab & Infliximab). Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε ανταποκριθέντες και μη ανταποκριθέντες βάση του δείκτη CDAI.

Γονίδιο, Πολυμορφισμός	Test	Ανταποκριθέντες	Μη-ανταποκριθέντες	P
<b>TNFSF11-290T/C (rs9525641)</b>	Genotypic [TT/TC/CC]	9/15/5	12/9/2	0.279
	Cochran-Armitage [T/C]	33/25 (0.57)	33/13 (0.72)	0.152
	Επικρατές [(TT+TC)/CC]	24/5	21/2	0.444
	Υπολειπόμενο [TT/(TC+CC)]	9/20	12/11	0.159

Σε αυτό τον πίνακα αναλύθηκαν οι γονότυποι των ασθενών όσον αφορά και τους δύο αντι-TNFα παράγοντες (Adalimumab & Infliximab) και κατηγοριοποιήθηκαν σε ανταποκριθέντες και μη-ανταποκριθέντες. Συγκεκριμένα εκ των ανταποκριθέντων 9 είναι ομόζυγοι στο T αλληλόμορφο και 5 στο C ενώ 15 είναι ετερόζυγοι. Στους μη ανταποκριθέντες 12 είναι ομόζυγοι στο T αλληλόμορφο, 2 στο C αλληλόμορφο και 9 είναι ετερόζυγοι. Ανάλυση με το Cochran-Armitage έδειξε την συχνότητα του κοινού αλληλομόρφου T στους ανταποκριθέντες να είναι ίση 0.57 ενώ στους μη ανταποκριθέντες να είναι ίση με 0.72. Παρόλα αυτά το  $p=0.152$  οπότε το αποτέλεσμα δεν είναι στατιστικά σημαντικό. ( $p<0.05$ )

Πίνακας 6: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης για τους ασθενείς που λάμβαναν τον βιολογικό παράγοντα Adalimumab. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε ανταποκριθέντες και μη ανταποκριθέντες βάση του δείκτη CDAI.

Γονίδιο, Πολυμορφισμός	Test	Ανταποκριθέντες	Μη-Ανταποκριθέντες	P
<b>TNFSF11-290T/C (rs9525641)</b>	Genotypic [TT/TC/CC]	6/1/0	3/2/0	1.000
	Cochran-Armitage [T/C]	13/1 (0.93)	8/2 (0.80)	0.550
	Επικρατές [(TT+TC)/CC]	7/0	5/0	0.523



	Υπολειπόμενο [TT/(TC+CC)]	6/1	3/2	1.000
--	------------------------------	-----	-----	-------

Μετά από στατιστική ανάλυση των γονοτύπων και των αλληλομόρφων των ασθενών που λάμβαναν το Adalimumab, παρατηρείται πως εκ των ανταποκριθέντων 6 ασθενείς είναι ομόζυγοι ως προς το T αλληλόμορφο κανέννας ως προς το C αλληλόμορφο ενώ ένας είναι ετερόζυγος. Όσον αφορά στους μη ανταποκριθέντες 3 είναι ομόζυγοι ως προς το T αλληλόμορφο και κανέννας ως προς το C αλληλόμορφο ενώ δύο είναι ετερόζυγοί. Ανάλυση με το Cochran-Armitage έδειξε αυξημένη συχνότητα του αλληλομόρφου T σε όλους τους ασθενείς. Δεδομένου ότι το  $p=0.550$  παρατηρείται πως το αποτέλεσμα δεν είναι στατιστικά σημαντικό ( $p<0.05$ ).

Αυτό πιθανώς οφείλετε στο μικρό δείγμα σθενών που λάμβαναν το Adalimumab αφού η πλειονότητα του δείγματος υπό μελέτη λαμβάνει το Infliximab.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης για τους ασθενείς που λάμβαναν τον βιολογικό παράγοντα Infliximab. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε ανταποκριθέντες και μη ανταποκριθέντες βάση του δείκτη CDAI.

Γονίδιο, Πολυμορφισμός	Test	Ανταποκριθέντες	Μη- ανταποκριθέντες	P
<b>TNFSF11 -290T/C (rs9525641)</b>	Genotypic [TT/TC/CC]	2/14/5	9/7/2	0.019
	Cochran- Armitage [T/C]	18/24 (0.43)	25/11 (0.74)	0.023
	Επικρατές [(TT+TC)/CC]	16/5	16/2	0.011
	Υπολειπόμενο [TT/(TC+CC)]	2/19	9/9	0.418

Η κατηγοριοποίηση των ασθενών μόνο για το Infliximab έδειξε πως 2 εκ των ανταποκριθέντων ασθενών είναι ομόζυγοι ως προς το T αλληλόμορφο, 5 ως προς το C αλληλόμορφο ενώ 14 είναι ετερόζυγοι. Όσον αφορά στους μη ανταποκριθέντες 9 είναι ομόζυγοι ως προς το T αλληλόμορφο και 2 ως προς το C αλληλόμορφο ενώ 7 είναι ετερόζυγοί. Όσον αφορά την συχνότητα του κοινού αλληλομόρφου T παρατηρείται αυξημένη στους μη ανταποκριθέντες(0.74) , με τον δείκτη στατιστικής σημαντικότητας  $p=0.023$  για ( $p<0.05$ ). Ακόμα η δοκιμή για επικράτεια δείχνει πως το T είναι επικρατές με  $p=0.011$ . Επίσης υπολογίστηκε και το Odd Ratio (αναλογία πιθανοτήτων) = 3.030 [C.I 95% (1.079-8.654)] κάτι που δείχνει πως κάποιος που φέρει το αλληλόμορφο C έχει 3 φορές περισσότερες πιθανότητες να ανταποκριθεί σε θεραπεία με το Infliximab.

Συμπερασματικά, φαίνεται πως ο πολυμορφισμός -290T/C του γονιδίου *RANKL* με rs9525641 σχετίζεται με την ανταπόκριση των ασθενών σε θεραπεία με Infliximab.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι Ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, προσβάλλουν το 0.1% του γενικού πληθυσμού όμως τα τελευταία χρόνια παρουσιάζουν ραγδαία αυξητικές τάσεις. Οι ΙΦΝΕ είναι πολυπαραγοντικά αυτοάνοσα νοσήματα, δηλαδή έχουν γενετικό υπόβαθρο αλλά στην εκδήλωσή τους συμμετέχουν και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Η αύξηση του πληθυσμού στα αστικά κέντρα, η αγχώδης καθημερινότητα και οι αλλαγές στις διατροφικές συνήθειες είναι κάποιοι από τους λόγους που οι ΙΦΝΕ παρουσιάζουν αυξητικές τάσεις.

Για την αντιμετώπιση των ΙΦΝΕ οι θεραπείες που χορηγούνται στους ασθενείς μπορεί να είναι συστηματικές ή ανοσοκατασταλτικές ανάλογα της σοβαρότητας των συμπτωμάτων, όμως η είσοδος των αντι-TNFα ( Adalimumab, Infliximab) έχει επιφέρει επανάσταση στον τομέα της θεραπείας διότι ένα 60-70% των ασθενών φαίνεται πως ανταποκρίνεται θετικά. Υπάρχει όμως ένα 30% των ασθενών που δεν ανταποκρίνεται σε αυτές τις θεραπείες. Εδώ έρχεται να συμβάλει η φαρμακογενετική η οποία μελετάει την συσχέτιση κάποιων πολυμορφισμών σε γονίδια με το κατά πόσο μπορεί να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου στον κάθε ασθενή.

Στην μεγαλύτερη φαρμακογενετική μελέτη που έγινε το 2014 (n=738) μελετήθηκε το κλασικό μονοπάτι ενεργοποίησης του NFκB και βρέθηκε πως υπάρχουν 19 μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί σε 14 γονίδια που σχετίζονται με την ανταπόκριση σε αντι-TNFα βιολογικούς παράγοντες (Bank et al, 2014)

Όμως, εκτός του κλασικού μονοπατιού ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NFκB υπάρχει και το εναλλακτικό μονοπάτι ενεργοποίησης. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το εναλλακτικό μονοπάτι του NFκB και συγκεκριμένα ο λειτουργικός πολυμορφισμός -290 T/C (rs9525641) ο οποίος βρίσκεται στον υποκινητή του γονιδίου TNFSF11 ή RANKL. Η RANKL όταν συνδέεται με τον διαμεμβρανικό της υποδοχέα αναστέλει την δράση της TRAF3 με αποτέλεσμα να συνεχίζει η μεταγωγή σήματος και να ενεργοποιεί το εναλλακτικό μονοπάτι ενεργοποίησης του NFκB όπως φαίνεται στην εικόνα 6, και σαν αποτέλεσμα να επάγεται η φλεγμονή και να παραμένουν ή να χειροτερεύουν τα συμπτώματα των ασθενών.

Όσον αφορά στον πολυμορφισμό που επιλέχθηκε για αυτή τη μελέτη, είναι ο λειτουργικός πολυμορφισμός rs9525641. Ο χαρακτηρισμός ενός πολυμορφισμού ως λειτουργικού σημαίνει πως η ύπαρξη του πολυμορφισμού στο γονίδιο επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου. Αυτό μελετήθηκε από ερευνητές, σε πείραμα λουσιφεράσης όπου τα πλασμίδια που έφεραν το ένα αλληλόμορφο είχαν διαφορετικά επίπεδα ενεργότητας της λουσιφεράσης από τα πλασμίδια που έφεραν το άλλο αλληλόμορφο (Wenfeng Tan et al, 2010). Συγκεκριμένα τα πλασμίδια που έφεραν το κοινό αλληλόμορφο T είχαν αυξημένη ενεργότητα λουσιφεράσης άρα και αυξημένα επίπεδα του mRNA του RANKL, άρα και συνεχής ενεργοποίηση του εναλλακτικού μονοπατιού του NFκB κάτι το οποίο συνεπάγεται

αυξημένα επίπεδα TNFα. Αυτό σημαίνει πως αυτοί οι ασθενείς, λόγω των αυξημένων επιπέδων TNFα στον οργανισμό τους, να μην ανταποκρίνονται θετικά σε θεραπεία με αντι-TNFα. Σε αντίθεση τα πλασμίδια με το σπάνιο αλληλόμορφο C είχαν μειωμένη ενεργότητα της λουσιφεράσης άρα και μειωμένα επίπεδα του mRNA του RANKL κάτι που σημαίνει μειωμένη ενεργοποίηση του εναλλακτικού μονοπατιού του NFκB και μειωμένα επίπεδα TNFα. Συνεπώς οι αντι-TNFα βιολογικοί παράγοντες να μπορούν να δεσμεύσουν τον TNFα και να έρχονται οι ασθενείς σε ύφεση.

Από τους ασθενείς που συμμετείχαν σε αυτή την έρευνα και οι οποίοι λάμβαναν αντι-TNFα θεραπεία για 24 μήνες, το 56% αυτών ανταποκρίθηκε θετικά και εισήλθε σε ύφεση, βάση του δείκτη CDAI. Αφού έγινε γονοτύπηση των ασθενών για τον πολυμορφισμό -290 T/C ακολούθησε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Η ανάλυση όλων των ασθενών και για τα δύο φάρμακα δεν είχε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα με το  $P=0.152$ . Όταν όμως έγινε κατηγοριοποίηση των ασθενών ως προς το φάρμακο που λάμβαναν φάνηκε πως υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του αλληλομόρφου -290 C και στην ανταπόκριση των ασθενών στο Infliximab (το οποίο λάμβανε η πλειοψηφία των ασθενών) διότι υπήρχε αυξημένη συχνότητα του αλληλομόρφου -290 C στους ανταποκριθέντες (0.57) σε σχέση με τους μη ανταποκριθέντες (0.26) με  $P=0.023$ , όπως φαίνεται στον πίνακα 7.

Ακόμη έγινε υπολογισμός του Odd Ratio και βρέθηκε  $OR=3.03$  κάτι που σημαίνει πως κάποιος που φέρει το αλληλόμορφο C έχει τρεις φορές περισσότερες πιθανότητες να ανταποκριθεί θετικά σε θεραπεία με Infliximab.

Αυτή μελέτη αποτελεί την πρώτη ένδειξη συμμετοχής και του εναλλακτικού μονοπατιού ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NFκB στην ανταπόκριση σε θεραπεία με αντι-TNFα παράγοντες σε ασθενείς με ΙΦΝΕ. Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών μπορεί να αναδείξει τον πολυμορφισμό -290 T/C (rs9525641) του γονιδίου TNFSF11 ως έναν προγνωστικό δείκτη και να βοηθήσει στην καλύτερη και πιο εξατομικευμένη θεραπεία σε ασθενείς με ΙΦΝΕ.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alan F. Hofmann, M.D., and J. Rainer Poley M.D. Cholestyramine Treatment of Diarrhea Associated with Ileal Resection. *N Engl J Med* 1969; 281:397-402.
2. Andrea Cassinotti, Sandro Ardizzone, and Gabriele Bianchi Porro. Adalimumab for the treatment of Crohn's disease. *Biologics*. 2008 Dec; 2(4): 763–777.
3. Ashwin N.Ananthakrishnan Environmental Triggers for Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2010 May; 6(5): 339–346.
4. Baumgart DC, Carding SR . Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*. 2007 May 12;369(9573):1627-40
5. Best WR, Becketl JM, Singleton JW, Kern F Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*. 1976 Mar;70(3):439-44.
6. Brand, S. et al. IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *AJP Gastrointestinal and Liver Physiology*. 05/2006; 290(4):G827-38.
7. C .Gasche, M.C.E Lomer, I.Cavill, and G.Weiss. Iron, anaemia, and inflammatory bowel diseases . *Gut*. 2004 Aug; 53(8): 1190–1197. *Clin Exp Gastroenterol*. 2011; 4: 163–172.
8. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. *Gastroenterology*. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011;140:1785–1794.*Curr Treat Options Gastroenterol*. 2005 Jun;8(3):187-196.
9. D.Heresbach, Inflammatory bowel disease.Frequency and significance of granulomas in a cohort of incident cases of Crohn's disease. *Gut* 2005;54:215-222
10. Dana J. Philpott, Matthew T. Sorbara, Susan J. Robertson, Kenneth Croitoru & Stephen E. Girardin. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Gut*. 1994 Mar;35(3):369-72.
11. David Q Shih and Stephan R Targan. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008 Jan 21; 14(3): 390–400.
12. E.F.Stange, S.P.L Travis, S.Vermeire, C.Beglinger, L.Kupcinkas, K.Geboes, A Barauskiene, V.Villanacci, A.Von Herbay, B.F.Warren, C Gasche, H Tilg, Stefan W Schreiber, J Schölmerich, and W Reinisch. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut* 2006;55:i16-i35

13. E.V. Tsianos K.H. Katsanos D. Christodoulou A. Kogevinas, R.F. Logan and the N.W. Greece IBD group. The epidemiological profile of inflammatory bowel disease in different parts of North-West Greece. *Annals of gastroenterology* 2005, 18(4):434-440.
14. Epameinondas V Tsianos, Konstantinos H Katsanos, and Vasileios E Tsianos. *World J Gastroenterol*. Role of genetics in the diagnosis and prognosis of Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2012 Jan 14; 18(2): 105–118.
15. Fazl Q Parray, Mohd L W. Ulcerative Colitis: A Challenge to Surgeons. *Int J Prev Med*. 2012 Nov; 3(11): 749–763.
16. Franke A, Dermot P B Mc Govern et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nature Genetics* 42,1118–1125 2010.
17. Gary R. Lichtenstein, Songkai Yan, Mohan Bala, Marion Blank, Bruce. Infliximab maintenance treatment reduces hospitalizations, surgeries, and procedures in fistulizing Crohn's disease . 2005.
18. Guoqing Chen, David V. Goeddel. TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway. *Science* 31 May 2002 Vol. 296 no. 5573 pp. 1634-1635.
19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0048967/> Date: 08 Dec 2012.
20. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s), *Microsc Res Tech*. 2000 Aug 1;50(3):184-95.
21. J.-P. Hugot, H. Zouali, S. Lesage, G. Thomas. Etiology of the inflammatory bowel diseases. *International Journal of Colorectal Disease* March 1999, Volume 14, Issue 1, pp 2-9.
22. Jean-Frederic Colombel, Edward V. Loftus Jr, William J. Tremaine, Laurence J. Egan, W.Scott Harmsen, Cathy D. Schleck, Alan R. Zinsmeister, William J. The safety profile of infliximab in patients with Crohn's disease: The Mayo Clinic experience in 500 patients. *Gastroenterology*, Volume 126, Issue 1, January 2004, Pages 19–31.
23. John K Triantafillidis, Emmanuel Merikas, and Filippos Georgopoulos. Current and emerging drugs for the treatment of inflammatory bowel disease. *Drug Des Devel Ther*. 2011; 5: 185–210.
24. Joseph Keane, M.D., Sharon Gershon, Pharm.D., Robert P. Wise, M.D., M.P.H., Elizabeth Mirabile-Levens, M.D., John Kasznica, M.D., William D. Schwieterman, M.D., Jeffrey N. Siegel, M.D., and M. Miles Braun, M.D., M.P.H. Tuberculosis Associated with Infliximab, a Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ -Neutralizing Agent. *N Engl J. Med* 2001; 345:1098-1104 October 11, 2001.

25. Karlinger K, Györke T, Makö E, Mester A, Tarján Z. Eur J Radiol. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Eur J Radiol. 2000 Sep;35(3):154-67.
26. Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scallon B, Moore MA, Vilcek J, Daddona P, et al. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. Mol Immunol. 1993 Nov;30(16):1443-53.
27. Kokona Chatzantoni and Athanasia Mouzaki. Anti-TNF- $\alpha$  Antibody Therapies in Autoimmune Diseases. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2006, 6, 1707-1714.
28. Kori.L.Wallace, Li-Bo Zheng, Yoshitake Kanazawa, and David.Q.Shih. Immunopathology of inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2014 Jan 7.
29. Leah Gilroy and Patrick B Allen. Is there a role for vedolizumab in the treatment of ulcerative colitis and Crohn's disease? Clin Exp Gastroenterol. 2014; 7: 163–172.
30. Leena Halme, Paulina Paavola-Sakki, Ulla Turunen, Maarit Lappalainen, Martti Färkkilä, and Kimmo Kontula. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2006 Jun 21; 12(23): 3668–3672.
31. Lin-Jing Li, Chen Gong, Mei-Hua Zhao, and Bai-Sui Feng. Role of interleukin-22 in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2014 Dec 28; 20(48): 18177–18188.
32. Luisa Guidi, Daniela Pugliese, and Alessandro Armuzzi. Update on the management of inflammatory bowel disease: specific role of adalimumab. Clin Exp Gastroenterol. 2011; 4: 163–172.
33. Luke Jostins,Stephan Ripke, Rinse K. Weersma, Richard H. Duerr, Dermot P. McGovern, Ken Y. Hui, James C. Lee, L. Philip Schumm, Yashoda Sharma, Carl A. Anderson, Jonah Essers, Mitja Mitrovic, Kaida Ning, Isabelle Cleynen, Emilie Theatre, Sarah L. Spain, Soumya Raychaudhuri, Philippe Goyette, Zhi Wei, Clara Abraham,Jean-Paul Achkar, Tariq Ahmad, Leila Amininejad, Ashwin N. Ananthakrishnan, Vibeke Andersen *et al.* Host–microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. Nature, 491,119–124 (01 November 2012).
34. Marc Feldmann, Fionula M. Brennan , Brian M.J. Foxwell , Peter C. Taylor , Richard O. Williams , R.N. Maini. Anti-TNF therapy: Where have we got to in 2005. Journal of Autoimmunity, 2005.
35. Marie Pierik, Paul Rutgeerts, Robert Vlietinck, and Severine Vermeire. Pharmacogenetics in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2006 Jun 21; 12(23): 3657–3667.
36. Martin W. Laass. Diagnosis and classification of Crohn's disease. April–May 2014 World J Gastrointest Pathophysiol. Volume 13, Issues 4–52014 Aug 15; 5(3): 205–212.

37. Michael Scharl and Gerhard Rogler. Pathophysiology of fistula formation in Crohn's disease. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2014 Aug 15; 5(3): 205–212.
38. Natalie A. Molodecky, BSc and Gilaad G. Kaplan. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2010 May; 6(5): 339–346.
39. Deborah Veis Novack, Role of NF-κB in the skeleton. *Cell Res*. 2011 Jan; 21(1): 169–182.
40. Ole Haagen Nielsen. New Strategies for Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Front Med (Lausanne)*. 2014; 1: 3.
41. Olivier Micheau, Jürg Tschopp. Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes. 25 July 2003, *Cell*, Volume 114, Issue 2, Pages 181–190.
42. Rayhorn, Nancy RN, BSN, CGRN. Treatment of Inflammatory Bowel Disease in the Adolescent. *Journal of Infusion Nursing: July/August 2001 - Volume 24 - Issue 4 - pp 255-262*.
43. Richard B Geary<sup>1</sup> and Murray I Barclay. Azathioprine and 6-mercaptopurine pharmacogenetics and metabolite monitoring in inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, August 2005, Volume 20, Issue 8, pages 1149–1157.
44. Rutgeerts P, Vermeire S, Van Assche G. Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2009 Apr; 136(4):1182-97.
45. S Bank, P S Andersen, J Burisch, N Pedersen, S Roug, J Galsgaard, S Y Turino, J B Brodersen, S Rashid, B K Rasmussen, S Avlund, T B Olesen, H J Hoffmann, M K Thomsen, V Ø Thomsen, M Frydenberg, B A Nexø, J Sode, U Vogel and V Andersen. Associations between functional polymorphisms in the NFκB signaling pathway and response to anti-TNF treatment in Danish patients with inflammatory bowel disease. *Pharmacogenomics J*. 2014 Dec; 14(6):526-34.
46. S. Mascheretti, J. Hampe, T. Kühbacher, H. Herfarth, M. Krawczak, U. R. Fölsch and S. Schreiber. Pharmacogenetic investigation of the TNF/TNF-receptor system in patients with chronic active Crohn's disease treated with infliximab. *The Pharmacogenomics Journal*, 2002. 2, 127–136.
47. Sagar Garud and Mark A. Peppercorn. Ulcerative Colitis: Current Treatment Strategies and Future Prospects. *Therap Adv Gastroenterol*. 2009 Mar; 2(2): 99–108.
48. Sandborn WJ, van Assche G, Reinisch W, et al. Adalimumab induces and maintains clinical remission in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2013 May; 9(5): 317–320.

49. Simona Menceja, Janez Prezelj, Andreja Kocijancic, Barbara Ostaneka, Janja Marc. Association ofTNFSF11 gene promoter polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women. *Maturitas* 55, 3 March 2006. 219–226.
50. Stuart A. Scott, PhD. Personalizing medicine with clinical pharmacogenetics. *Genet Med*. 2011 Dec; 13(12): 987–995
51. Taishin Akiyama, Miho Shinzawa, and Nobuko Akiyama. RANKL-RANK interaction in immune regulatory systems. *World J Orthop*. 2012 Sep 18; 3(9): 142–150
52. Travassos WJ, Cheifetz AS. Infliximab: Use in Inflammatory Bowel Disease. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2005 Jun;8(3):187-196.
53. Tsianos EV, Masalas CN, Merkouropoulos M, Dalekos GN, Logan RF. Incidence of inflammatory bowel disease in north west Greece: rarity of Crohn's disease in an area where ulcerative colitis is common. *Gut*. 1994 Mar;35(3):369-72.
54. Warren Strober, Ivan Fuss, and Peter Mannon. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*. 2007 Mar 1; 117(3): 514–521.
55. Wenfeng Tan, Hui Wu, Jian Zhao, et.al. A Functional *RANKL* Polymorphism Associated with Younger Age at Onset of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010 Oct; 62(10): 2864–2875.
56. You-Sun Kim, Michael J. Morgan, Swati Choksi, Zheng-gang Liu. Induced Activation of the Nox1 NADPH Oxidase and Its Role in the Induction of Necrotic Cell Death. *Molecular Cell*, Volume 26, Issue 5, 8 June 2007, Pages 675–687.